

Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão

Antimicrobial activity methodologies applied to plants extracts: comparison between two agar diffusion techniques

Luiz Mário da Silva Silveira¹; Roberto Sifrido Gallegos Olea²; Josinete Santos Mesquita³; América de Lourdes Nogueira da Cruz⁴ & Janice Corrêa Mendes⁵

RESUMO – Com o aumento dos microrganismos resistentes às substâncias antimicrobianas já conhecidas, vários extratos de plantas medicinais já foram testados, com a finalidade de procurar novos compostos com atividade antimicrobiana reconhecida. Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para medir a atividade *in vitro* de microrganismos contra os agentes antimicrobianos. Quando se trata de extratos vegetais, se aplica um grande número de metodologias para detecção de atividade antimicrobiana e, as técnicas de difusão são as mais adequadas para se trabalhar com extratos vegetais coloridos e/ou extraídos com solventes orgânicos, aliado ao fato que a cor não irá interferir na leitura dos resultados. Este trabalho tem como objetivo fazer um estudo comparativo entre as técnicas difusão em ágar pelo disco de papel e de poço utilizando extrato etanólico das cascas de frutos de *Punica granatum* L. (romã) e cloranfenicol como antimicrobiano controle. Utilizou-se análise estatística para verificar se há diferença significativa entre as duas técnicas para todas as concentrações testadas. Utilizou-se diluição de extratos na faixa de 75 a 3.000µg (disco e poço). O extrato de frutos de romã foi ativa aos microrganismos testados até a concentração de 300µg pela técnica de disco-difusão, enquanto que pela técnica poço-difusão o extrato mostrou-se ativa até a menor concentração testada, 75µg. Concluímos que a técnica do poço se apresentou mais sensível para determinação antimicrobiana de extratos vegetais que a técnica do disco.

PALAVRAS-CHAVE – Atividade antimicrobiana, difusão em ágar, técnica do disco, técnica do poço..

SUMMARY – With the increase of the resistance of microorganisms to known drugs, some extracts of medicinal plants had been tested, with the purpose to search new compounds with recognized antimicrobial activity. A great variety of methods can be used to measure the *in vitro* activity of drugs against microorganisms. To vegetal extracts, it has been applied a great number of methodologies for detection of antimicrobial activity and the diffusion techniques are the most adequate for this because we can work with colorful or organic extracts, besides the fact that the color will not interfere in the reading of the results. This work has the objective to make a comparative study into the agar diffusion techniques, well and disk, using alcoholic extract of *Punica granatum* L. Statistical analysis was used to verify if it has significant difference enters the two techniques for all the tested concentrations. Extract dilution was used in the band of 75 the 3,000µg (disks and well). The extract of fruits *Punica granatum* L. was active to the tested microorganisms until the concentration of 300µg for the disk-diffusion technique, while that for the technique well-diffusion the extract revealed active until the concentration of 75µg. We conclude that the technique of well diffusion presented more sensible for antimicrobial activity.

KEYWORDS – Antimicrobial activity, agar diffusion, disk method, agar-well method.

INTRODUÇÃO

As pesquisas com propósito de obter novos medicamentos a partir de plantas, ou de aprimorar fitoterápicos já existentes, vêm reassumindo papel importante nos últimos anos. Nesse contexto, 30% dos medicamentos produzidos pelos países desenvolvidos são provenientes de recursos naturais. No período de 1941 a 2002, dos 90 fármacos analisados no *Annual Reports of Medicinal Chemistry*, 61 eram derivados semi-sintéticos de plantas e nove eram oriun-

das de produtos naturais (SIXEL & PECINALLI²²; NEWMANN & *et al.*¹⁶).

Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja um fato recente, somente a partir da descoberta da penicilina é que esta busca teve grande impulso (COELHO & *et al.*⁵). As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos como alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos terpenos, poliacetilenos, que por vezes, são específicos de determinadas

Aceite em 27/5/2009

Trabalho realizado no Laboratório Corrêa Mendes (São Luís-MA) e Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). ¹Professor Assistente do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). ²Professor Titular do Departamento de Química da UFMA. ³Aluna de Graduação do Curso de Farmácia da UFMA.

⁴Farmacêutica-Bioquímica do Laboratório Corrêa Mendes. ⁵Farmacêutica-Bioquímica e Diretora Geral do Laboratório Corrêa Mendes

famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (COWAN⁶; CLARKE & *et al.*⁴; SIMÕES & *et al.*²¹; SOUZA & *et al.*²⁴). Com o avanço das pesquisas, foram atribuídas às referidas substâncias importâncias relevantes no mecanismo de defesa das plantas contra seus predadores, sejam fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos ou animais superiores (YUNES & CALIXTO²⁸; NIERO & *et al.*¹⁶). Além disso, em determinadas circunstâncias, algumas plantas superiores podem formar substâncias de natureza antimicrobiana, denominadas fitoalexinas. Estas são produzidas como resposta imediata a agressões por fungos, bactérias, vírus ou nematóides ou em função de determinados estímulos, como radiações, agentes químicos e outras injúrias (LIMA¹²; YUNES & CALIXTO²⁸).

Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para medir a atividade *in vitro* de microrganismos contra os agentes antimicrobianos. Uma variedade de métodos é encontrada para esse efeito e como não são todos baseados no mesmo princípio, os resultados obtidos serão também profundamente influenciados, não só pelo método escolhido, mas também pelos microrganismos utilizados para realizar o teste, e pelo grau de solubilidade de cada teste (VANDEN BERGHE & *et al.*²⁶). Os principais métodos microbiológicos de detecção de atividade antimicrobiana encontrados na literatura tanto para detecção da atividade de bactérias como fungos podem ser classificados em três tipos: ensaios bioautográficos, de difusão e de diluição (RIOS & *et al.*²⁰).

Os ensaios bioautográficos são aqueles que empregam placas de cromatografia de camada fina (CCF) para a análise. Os compostos separados por CCF são colocados por contato em placas de ágar previamente inoculadas com o microrganismo teste. Zonas de inibição de crescimento microbiano indicam a presença de substâncias antimicrobianas (RIOS & *et al.*²⁰; BRANDÃO²). Estes métodos têm importância particular na pesquisa de compostos antimicrobianos vegetais, pois permitem a localização direta dos constituintes ativos a partir de uma matriz complexa sendo, portanto, um método qualitativo (HOSTETTMANN & MARSTON¹¹).

Ensaio de diluição são aqueles nos quais os extratos ou substâncias a serem testadas são adicionados a um meio de cultura líquido, previamente inoculado com o microrganismo teste. Após incubação, o crescimento do microrganismo é determinado pela leitura visual direta ou turbidimétrica pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (VANDEN BERGHE & VLIETINCK²⁶).

Os ensaios de difusão são métodos quantitativos, nos quais o efeito pode ser graduado. Fundamentam-se na difusão da substância a ser ensaiada, em um meio de cultura sólido e inoculado com o microrganismo. A partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, no qual não há crescimento do microrganismo, denominado halo de inibição. Diferentes tipos de reservatórios podem ser empregados incluindo discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e poços feitos no meio de cultura (VANDEN BERGHE & VLIETINCK²⁶). A substância ou extrato a ser testado é colocado em contato com o meio de cultura inoculado, e a maneira como se processa esse contato define os diferentes métodos de difusão, dentre eles, método do disco difusão, método dos cilindros e método de poços (RIOS & *et al.*²⁰).

Quando se trata de extratos vegetais, se aplica um grande número de metodologias para detecção de atividade antimicrobiana, e as técnicas de difusão, aqui inclusive discos e

poços, são as mais adequadas para se trabalhar com extratos vegetais coloridos e ou extraídos com solventes orgânicos, pois é possível evaporar o solvente do disco, antes da colocação deste no meio de cultura e/ou colocar quantidade definida diretamente no poço (RIOS & *et al.*²⁰), aliado ao fato que a cor não irá interferir na leitura dos resultados.

Levando-se em consideração o grande número de trabalhos de avaliação de atividade antimicrobiana em extratos que são publicados e a não uniformidade na interpretação dos resultados em relação à atividade antimicrobiana, este trabalho tem por objetivo fazer um estudo comparativo entre as duas principais técnicas de difusão em ágar utilizadas para a determinação de atividade antimicrobiana em extratos vegetais, difusão em disco e em poço.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Utilizou-se o extrato hidroalcoólico das cascas dos frutos de *Punica granatum L.* gentilmente cedido pelo Prof. Ênio Fernandes de Aragão Soares, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão, que foi preparado da seguinte maneira (SOARES²³):

“As amostras de caule, folhas e frutos referentes à segunda coleta foram obtidas em um quintal no bairro Maiobão em Paço do Lumiar – MA no mês de fevereiro de 2002, obedecendo-se o período de frutificação da espécie. As amostras foram catalogadas no Herbário Ático Seabra, sob o número 1002. As amostras das cascas dos frutos foram dessecadas em estufa à 45°C e submetidas a extrações sucessivas em solventes por ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila, álcool etílico 96% na proporção 1:2p/v.”

Preparo de extratos para realização do método de difusão em ágar

Prepararam-se seis extratos diferentes a partir do extrato hidroalcoólico, sendo que cada concentração correspondeu a uma massa impregnada (Quadro 1).

QUADRO 1
Concentração dos extratos empregados nos testes de atividade antimicrobiana

| | Massa correspondente |
|----------|----------------------|
| 60mg/mL | 3.000µg |
| 24mg/mL | 1.200µg |
| 12mg/mL | 600µg |
| 6mg/mL | 300µg |
| 3mg/mL | 150µg |
| 1,5mg/mL | 75µg |

Atividade antimicrobiana

- Microrganismos utilizados

Foi utilizada cepa padrão de *Staphylococcus aureus* e isolados bacterianos de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* – negativo (CN) (Quadro 2). Todas as cepas bacterianas selecionadas neste trabalho mostraram-se sensíveis a cefotaxima, cefoxitina, ciprofloxacina, claritromicina, cloranfenicol, gentamicina e vancomicina.

QUADRO 2
Cepas bacterianas empregadas nos testes de atividade antimicrobiana

| Cepas | Origem |
|---|-------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC – 25932 | Cepa padrão |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 01 | Isolado de amostra hospitalar |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 02 | Isolado de amostra hospitalar |
| <i>Staphylococcus</i> CN 01 | Isolado de amostra hospitalar |
| <i>Staphylococcus</i> CN 02 | Isolado de amostra hospitalar |

- Método da difusão em ágar – técnica do poço

Esta técnica foi conduzida da seguinte maneira: As placas contendo ágar Mueller Hinton preparadas antecipadamente foram retiradas da geladeira até atingir a temperatura ambiente. Fizeram-se poços de 12mm de diâmetro. Com um swab estéril, o inóculo bacteriano com turvação 0,5 da escala de MacFarland foi distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar, deixadas em repouso em temperatura ambiente, por aproximadamente 3 minutos. Dispensou-se em cada poço devidamente identificado, 50µL dos controles positivo e negativo, assim como de cada concentração do extrato (1,5; 3; 6; 12; 24 e 60mg/mL), utilizado-se uma pipeta automática, sendo uma placa para cada concentração testada. As placas foram incubadas em estufa a 35±1°C por 24 horas. Mediu-se em milímetros o halo de inibição do crescimento, utilizando régua milimetrada. Descartou-se o diâmetro de leitura do poço. Os testes foram realizados em duplicata e em dias diferentes.

Como controle negativo foi utilizado o álcool etílico hidratado 96° e como controle positivo solução de cloranfenicol a 0,6mg/mL.

- Método da difusão em ágar – técnica do disco

O preparo dos discos de papel absorvente seguiu a técnica descrita na FARMACOPEIA BRASILEIRA⁹. Utilizaram-se discos de papel secos e estéreis, medindo 11mm de diâmetro. Aos discos, e com pipeta de volume regulável entre 5-50µL, foi transferido volume adequado de cada concentração de extrato, de controle positivo e de controle negativo, respectivamente (Quadro 3).

QUADRO 3
Concentração final do extrato em cada disco

| Concentração do extrato | Massa final em cada disco |
|---------------------------|---------------------------|
| 60mg/mL (solução inicial) | 3000µg |
| 24mg/mL | 1200µg |
| 12mg/mL | 600µg |
| 6mg/mL | 300µg |
| 3mg/mL | 150µg |
| 1,5mg/mL | 75µg |

Os discos com controle positivo foram preparados com massa correspondente a 30µg de cloranfenicol em cada disco. Os discos com controle negativo foram preparados com 50µL de álcool etílico hidratado 96°.

O procedimento foi realizado da seguinte maneira: As placas contendo ágar Mueller Hinton preparadas antecipadamente foram retiradas da geladeira até atingir a tempera-

tura ambiente. Com um swab estéril, o inóculo bacteriano foi distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar, deixadas em repouso em temperatura ambiente por aproximadamente 3 minutos. Utilizando-se pinça esterilizada, os discos, previamente impregnados com as soluções e os controles, foram distribuídos uniformemente sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas em estufa a 35±1°C por 24 horas. O halo de inibição do crescimento foi medido utilizando régua milimetrada. Descartou-se o diâmetro de leitura do disco. Os testes foram realizados em duplicata e em dias diferentes.

Análise estatística

Os resultados dos ensaios biológicos foram submetidos à análise estatística seguindo o modelo ANOVA one-way.

Na comparação entre as técnicas de poço e do disco foi utilizado o teste t de student para cada concentração e microrganismo, ao nível de significância de 5% (ZAR²⁹).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de vegetais permite detectar frações bioativas ou substâncias com atividade antimicrobiana. Nesse sentido, grande número de plantas tem sido investigado no seu potencial farmacológico, e o estudo de atividade antimicrobiana se constitui de grande importância devido o crescente problema de resistência de bactérias aos antimicrobianos em uso em terapêutica. Todavia, ainda existe muita confusão quanto à validade e viabilidade das informações relatadas acerca de atividade de extratos de plantas, sobretudo pela diversidade de técnicas que, via de regra, não estão padronizadas.

Com o objetivo de descartar possíveis hipóteses quanto à natureza do princípio inibidor produzido por uma espécie vegetal desconhecida em seus efeitos antimicrobianos, neste trabalho investigou-se a variabilidade de atividade de extratos de uma planta reconhecidamente antibacteriana, *Punica granatum* L. (romã), através de duas técnicas de ágar difusão, em disco e em poço, cujos resultados encontram-se ilustrados na Tabela I.

A utilização das metodologias de difusão em ágar demonstrou a manutenção da atividade antibacteriana sobre os microrganismos indicadores utilizados, reforçando a atividade biológica dessa planta já comprovada por inúmeros autores (DINIZ & et al.⁷; NASCIMENTO & et al.¹⁴; HOLETZ & et al.¹⁰; MACHADO & et al.¹³; VASCONCELOS & et al.²⁷; SOARES²³).

De acordo com a Tabela I, das cinco cepas bacterianas testadas pelas duas técnicas variantes de ágar difusão empregadas neste trabalho, todas se mostraram sensíveis até a concentração de 300mg/disco na técnica de ágar difusão-disco e 75mg/poço na técnica de ágar difusão-poço, sendo esta última a menor concentração testada.

Para a análise estatística dos dados, apenas os resultados obtidos nas três concentrações mais elevadas foram utilizadas, devido o fato de que não houve formação de halo de inibição na técnica de disco difusão nas concentrações de 150 e 75mg/disco.

Os resultados mostrados na Tabela I apontam para a maior sensibilidade do método de poço difusão, em relação ao método de disco difusão. ESTRELA⁸ relata que o método de difusão em ágar não oferece condições de igualdade para se

TABELA I
Comparação entre as médias dos halos de inibição do crescimento microbiano em mm, entre as técnicas do poço e do disco de papel

| Bactérias | Extrato de romã | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----------------|-------|-------|----------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|---|-------|-------|---|
| | 3.000 µg | | | 1.200 µg | | | 300 µg | | | 150 µg | | | 75 µg | | |
| | Disco | Poço | | Disco | Poço | | Disco | Poço | | Disco | Poço | | Disco | Poço | |
| | Média | Média | p | Média | Média | p | Média | Média | p | Média | Média | p | Média | Média | p |
| <i>S.aureus</i> ATCC | 18,0 | 22,5 | 0,295 | 16,5 | 21,5 | 0,228 | 10,2 | 16,2 | 0,017 | 0,0 | 12,0 | - | 0,0 | 8,8 | - |
| <i>S.aureus</i> 01 | 13,0 | 21,0 | 0,127 | 11,5 | 19,5 | 0,284 | 9,2 | 18,0 | 0,008 | 0,0 | 15,5 | - | 0,0 | 13,0 | - |
| <i>S.aureus</i> 02 | 16,0 | 25,2 | 0,004 | 14,2 | 21,0 | 0,087 | 14,0 | 20,2 | 0,702 | 0,0 | 15,8 | - | 0,0 | 11,0 | - |
| CN 01 | 20,0 | 24,0 | 0,216 | 11,0 | 19,0 | 0,030 | 9,2 | 15,2 | 0,162 | 0,0 | 12,2 | - | 0,0 | 10,0 | - |
| CN 02 | 18,0 | 23,5 | 0,116 | 11,0 | 19,5 | 0,003 | 9,8 | 19,0 | 0,078 | 0,0 | 14,2 | - | 0,0 | 14,5 | - |

A comparação entre as médias das técnicas do poço e do disco foi utilizado o teste t de Student, em nível de significância de 5%. Números de cor azul: há diferença significativa entre as médias. 0,0: não houve halo de inibição. -: não calculado.

comparar substâncias com solubilidade e difusibilidade distintas. Analisando substâncias com diferentes capacidades de difusão e dissociação, este pesquisador observou que algumas substâncias apresentam dificuldades de difusão e dissociação em ágar. RIBEIRO & SOARES¹⁹ afirmam que diversos fatores influenciam nesta técnica como a presença de enzimas bacterianas, a composição do meio, a difusão da substância no meio, a densidade do inóculo, o período de incubação, a temperatura e a estabilidade da substância em uso.

BANDEIRA & *et al.*¹ relatam que o teste de difusão em ágar tem eficiência para substâncias que são solúveis em água, possibilitando difusão destas através do meio de cultura. O peso molecular também pode dificultar a difusão no meio de cultura. Neste método, entretanto, a presença de matéria particulada na amostra pode interferir na difusão da substância antimicrobiana no ágar. Mas, o pequeno volume necessário e a possibilidade de testar de 5 a 6 compostos por placa frente a um único microrganismo são vantagens observadas quando esse é empregado (VANDEN BERGHE & VLIETINCK²⁶).

O método de poços se baseia na difusão radial das substâncias, e a presença de partículas em suspensão na amostra a ser testada é muito menos provável de interferir com a difusão da substância antimicrobiana no ágar que no disco de papel de filtro. De acordo com VANDEN BERGHE & VLIETINCK²⁶, o método do poço é o mais adequado para testar a difusão de substâncias em extratos etanólicos de plantas.

ORLANDO¹⁸ encontrou diferenças significativas entre as técnicas; porém, essas diferenças não foram conclusivas para a determinação de qual seja a melhor técnica a ser utilizada para o extrato hidroalcoólico da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). Com isso, pode-se afirmar que para a avaliação da atividade antimicrobiana desse extrato pelo método de difusão em ágar, as duas técnicas foram satisfatórias. OLIVEIRA¹⁷, realizando estudos de atividade antimicrobiana de extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* L., observou que o diâmetro do halo formado pela técnica do poço foi maior que o obtido pela técnica do disco. Entretanto, os resultados encontrados por VALGAS & *et al.*²⁵ apontaram para uma melhor sensibilidade do método de poço difusão, em vez da variante disco.

Os resultados encontrados utilizando o extrato de romã mostraram-se similares aos relatados por VALGAS & *et al.*²⁵, visto que o método de poço difusão mostrou-se mais efetivo que o método de disco difusão. Este último, que

utilizou papel filtro Whatman, que basicamente é composto de celulose ligado a glicose monomérico, tem muitos grupos hidroxílicos livres presentes em cada resíduo de glicose, onde, na presença de produto natural de natureza catiônico, seria esperado adsorver na superfície do disco e dificultar a sua difusibilidade no meio (BURGESS & *et al.*³). Existem inúmeros fatores que podem influenciar na resposta de um método em particular e, segundo VALGAS & *et al.*²⁵, os fatores limitantes observados na relação papel filtro e natureza da substância explicariam apenas em parte a superioridade da variante técnica de poço difusão em relação à técnica disco difusão.

BRANDÃO² relata que a resposta de um microrganismo será uma função direta do log da concentração da substância teste ou do antibiótico.

Nesse aspecto, observou-se que o coeficiente de correlação obtido a partir dos resultados da técnica ágar difusão disco variou de 0,729 a 1,000; por outro lado, a correlação obtida pela técnica ágar difusão poço variou de 0,738 a 0,987, não mostrando desse modo diferença pronunciada em termos de perfil de comportamento concentração x halo de inibição. Todavia, há de se considerar que, em se tratando de análise de valores individuais, foi observada diferença significativa quando da comparação do diâmetro do halo formado e a concentração correspondente. Estas diferenças, visto que não traduzem o comportamento global na metodologia, referem-se possivelmente a particularidades aleatórias presentes no processo, como crescimento bacteriano, espessura de ágar, densidade de inóculo, etc.

A Figura 1 ilustra o comportamento de difusibilidade

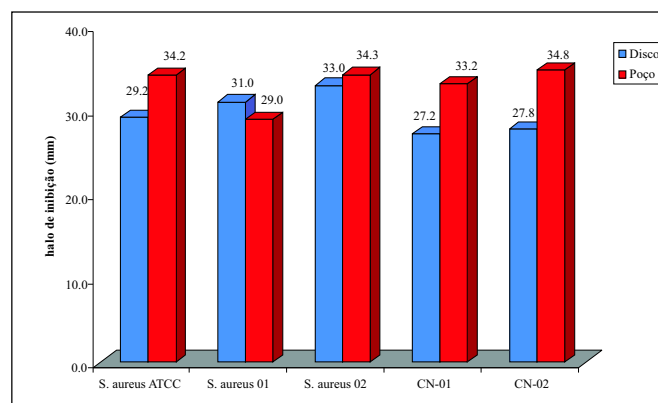


FIG. 1 - Relação cepa bacteriana e halo de inibição (mm) para o cloranfenicol 30mg, nas técnicas agar difusão disco e poço.

de ativa do cloranfenicol nas cepas bacterianas testadas.

O cloranfenicol, como substância controle, mostrou melhor perfil de difusibilidade quando empregada na técnica poço difusão, à exceção da cepa de *Staphylococcus aureus* 01, onde se observou melhor difusibilidade na técnica disco difusão. As cepas bacterianas, como arrolado anteriormente, apresentam bom espectro de sensibilidade aos antimicrobianos usuais, o que favorece a formação de halo de inibição consistente.

Entretanto, estes resultados, apesar de mostrar melhor efetividade em termos de tamanho de halo de inibição para a técnica de poço difusão, não prioriza o emprego deste nas avaliações de extratos de produtos naturais, ou mesmo invalida o emprego da metodologia de disco difusão pela sua menor difusibilidade. A rigor, estas técnicas são de difícil padronização em se tratando de avaliação de produtos naturais, uma vez que existe a possibilidade de interferência devida, sobretudo, à característica do material a ser trabalhado.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados indicaram que a técnica de ágar difusão poço mostrou-se mais sensível que a técnica de ágar difusão disco na análise de extratos vegetais hidroalcoólicos, embora ambos tenham se mostrado úteis para esta finalidade, aliado ao fato de que estas técnicas são mais simples e requerem relativamente pouco recurso para a sua execução.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho contou com o apoio do Laboratório Corrêa Mendes (São Luís – MA) e do Prof. Ênio Fernandes Aragão Soares, pela cessão dos extratos de romã.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BANDEIRA, M.F.C. & et al. *Jornal Brasileiro de Clínica Estética e Odontologia*, 3(17): 47, 1998.
2. BRANDÃO, G.C. *Isolamento biomonitorado de substâncias antimicrobianas de Polygonum spectabil Mart e determinação da CIM para uma chalcona antimicrobiana*. 2004. 194p. Tese de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFMG, Belo Horizonte.
3. BURGESS, J.G. & et al. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal of Biotechnology*, 70: 27-32, 1999.
4. CLARKE, J.M. & et al. Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. *Journal of Microbiological Methods*, 46(3): 261-267, 2001.
5. COELHO DE SOUZA, G. & et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 135-143, 2004.
6. COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-582, 1999.
7. DINIZ, M.F.F.M. & et al. *Memento fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica: conhecimentos populares e científicos*. João Pessoa: Universitária/UFPB, 1997.
8. ESTRELA, C.R.A. *Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares*. 2000. 88f. Tese de Mestrado - Instituto de Patologia Tropical e de Saúde Pública de Goiânia, Goiás.
9. FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
10. HOLETZ, F.B. & et al. Screening of some plants used in Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7): 1027-1031, 2002.
11. HOSTETTMMANN, K. & MARSTON, A. Search for new antifungal compounds from higher plants. *Pure Applied Chemistry*, 66(10/11): 2231-2234, 1994.
12. LIMA, E.O. *Estudo das dermatofitoses em João Pessoa – Paraíba e da atividade antifúngica de plantas medicinais da região contra alguns dos agentes isolados*. 1996. 180p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
13. MACHADO, T.B. & et al. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 13(5): 606-610, 2002.
14. NASCIMENTO, G.G.F. & et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Brazilian Microbiology*, 31: 247-256, 2000.
15. NEWMANN, D.J. & et al. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66: 1022-1037, 2003.
16. NIERO, R. & et al. *Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*. Editora UNIVALI, 2003.
17. OLIVEIRA, G.F. *Avaliação da atividade antimicrobiana, in vitro, do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de Syzygium cumini (L.) Skeels (Jambolão)*. 2005. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde, Franca – SP.
18. ORLANDO, S.C. *Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do Stryphnodendron adstringens (Martius) Coville (Barbatimão)*. 2005. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde, Franca – SP.
19. RIBEIRO, M.C. & SOARES, M.M.S.R. *Microbiologia prática: roteiro e manual*. São Paulo: Atheneu, 2000.
20. RIOS, J.L. & et al. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23: 127-149, 1988.
21. SIMÕES, C.M.O. & et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª. ed., 2003, 1102p.
22. SIXEL, P.J. & PECINALLI, N.R. Seleção de fármacos para pesquisa farmacológica. *Infarma*, 15(3-4): 70-73, 2002.
23. SOARES, E.F.A. *Abordagem fitoquímica da Punica granatum L. e a identificação de atividade antimicrobiana*. 2003. Monografia de Conclusão de Curso de Farmácia, UFMA, São Luís.
24. SOUZA, M.M. & et al. *Método de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos*. In: BRESOLIN, T.M.B. & GECHINEL FILHO, V. Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Editora Univali, 2003, 239p.
25. VALGAS, C. & et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 369-380, 2007.
26. VANDEN BERGHE, D.A. & VLIETINCK, A.J. p.47-69. *Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants*. In: DEY, P.M. & HARBONE, J.D. (eds), *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, 1991.
27. VASCONCELOS, L.C.S. & et al. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses*, 46: 192-196, 2003.
28. YUNES, R.A. & CALIXTO, J.B. *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Argos, 2001. 500p.
29. ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. 4th. ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice, 1998. 931 p.

Endereço para correspondência
Luiz Mário da Silva Silveira
Rua 02 Q-05 C-05 Res. Itaguará II – Cohatrac
65052-116 São Luís – MA
e-mail: luizmariosilveira@yahoo.com.br