

## EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA DO $^{60}\text{Co}$ SOBRE A AÇÃO ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS DE CASCAS E FOLHAS DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI

Edvane Borges da Silva<sup>1,2</sup>; Gustavo Henrique Farias dos Santos<sup>1</sup>; Jeniffer Maiza de Souza Lima<sup>2</sup>; Kêsia Xisto<sup>3</sup>; Rosilma de Oliveira Araújo<sup>3</sup> e Ademir de Jesus Amaral<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Estudos em Radioproteção e Radioecologia – GERAR  
Departamento de Energia Nuclear (DEN/UFPE)  
Av. Professor Luiz Freire, nº 1000 - CDU  
50740-540 Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup> Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE)  
Alto do Reservatório, S/N – Bela Vista  
50010-921 - Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Antibióticos (DA/UFPE)  
Av. Professor Moraes Rego, 1235 – CDU  
50670-901 Recife, PE, Brasil

### RESUMO

Várias substâncias presentes nas estruturas *Schinus terebinthifolius* Raddi apresentam ação antiinflamatória e antimicrobiana, tendo sido demonstrada, *in vitro*, atividades contra diversas espécies de bactérias e fungos. O uso da radiação gama apresenta potencialidade em diversas áreas da tecnologia, uma delas é sua utilização sobre materiais de origem vegetal, podendo ser um valioso meio de prevenir os riscos de contaminação fúngica na classe de produtos fitoterápicos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de cascas e folhas de *S. terebinthifolius* tratados com a radiação gama do  $^{60}\text{Co}$ . Foram usadas doses de 5,0; 7,5 e 10 KGy, sendo mantidos controles não irradiados. Para a determinação da atividade antimicrobiana foi aplicada a técnica de difusão em disco, para avaliar o diâmetro dos halos de inibição, contra bactérias gram-positiva, gram-negativas, álcool-ácido-resistente e levedura. A atividade antimicrobiana foi considerada significativa para halos  $\geq 15$  mm. Os resultados indicam uma intensificação de ação antimicrobiana de extratos de cascas, a 5.0 kGy, contra *S. aureus*. Foi realizada a microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CMB) de extratos de cascas, frente a oito isolados clínicos de *S. aureus*. Os valores de CMB mostraram que a radiação ionizante não produziu a intensificação da ação antibacteriostática de *S. terebinthifolius*, porém os resultados indicaram que extratos de cascas de *S. terebinthifolius* pode ser utilizado como agente antimicrobiano e a radiação ionizante como uma importante alternativa na conservação dessa característica.

### 1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços na indústria químico-farmacêutica, o alto custo dos fármacos convencionais, além dos diversos problemas que surgem em decorrência dos seus usos, tais como a maior agressão ao organismo humano e a notória incidência de efeitos colaterais, tem-se percebido um crescente interesse dos pesquisadores em estudar os fitoterápicos de tal

forma que estes possam, em diversas situações, substituir as drogas utilizadas nas mais diversas especialidades médicas, em todo o mundo [1].

O uso de antimicrobianos sintéticos em demasia levou ao surgimento e à disseminação de micro-organismos resistentes aos compostos antimicrobianos disponíveis no mercado [2,3]. Isto incentivou a busca por novas fontes de substâncias com atividades antimicrobianas, tais como as plantas utilizadas na medicina tradicional, que se apresentam como potenciais fontes de agentes de novas moléculas bioativas, as quais permitem a eficiência do tratamento a bacterioses e são combatentes de doenças consequentes da ação microbiana [4,5].

No entanto, os estudos científicos experimentais são essenciais para confirmar as possíveis propriedades antibióticas de um grande número de plantas e de seus produtos derivados [6, 7, 8].

Inúmeras espécies de plantas possuem propriedades medicinais comprovadas [9,10]. Dentre elas tem-se *Schinus terebinthifolius* Raddi, conhecida como aroeira, planta que ocorre de forma natural na Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil.

No Brasil, a aroeira ocorre em diversas regiões fitoecológicas, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul, em várias formações vegetais, sendo encontrada sob diferentes aspectos morfológicos, variando de pequenos arbustos até grandes árvores, o que demonstra o alto potencial adaptativo a diversos ambientes [11,12].

Esta planta se destaca por suas estruturas (folhas e cascas do caule) possuírem comprovadas ações antiinflamatória, antiulcerogênica, sendo utilizadas como antisséptico, no tratamento de estomatites, úlcera gastroduodenal, doenças venéreas, inflamação do útero, infecções do aparelho urinário, feridas na pele, diarreia, etc. [13,14]. Suas cascas e folhas são utilizadas na forma de decocto com fins expectorante, anti-séptico, antidiarréico e cicatrizante. Além isto, suas principais características morfo-histológicas e químicas levam ao seu reconhecimento laboratorial como uma droga antimicrobiana [15].

Como se percebe, diversos trabalhos sobre *Schinus terebinthifolius* têm sido realizados no Brasil, demonstrando suas inúmeras utilidades ao homem e ao ecossistema natural [16,17,18,19].

A bioatividade das plantas medicinais é inerente a um grupo de compostos chamados metabólitos secundários. Estes são sintetizados a partir de reações catabólicas, anabólicas e da biotransformação a partir dos aminoácidos, carboidratos e lipídios produzidos pela planta. Entre os principais metabólitos secundários, está o tanino, que se destaca pela sua variada atividade biológica [20].

As características fitoquímicas de *Schinus terebinthifolius* apontam para a presença de compostos, como óleos essenciais, taninos e flavonoides, os quais são produzidos através do seu metabolismo secundário distribuídos em teores e composições variáveis nas diferentes partes vegetais, como cascas, tronco, frutos e folhas, sendo utilizados nas indústrias de alimentos, de curtimento de couro, de perfumaria e de cosmetic [21,22].

Em estudo Martinez [23] observou que o extrato etanólico a 30% da aroeira apresentou atividade antibacteriana sobre as cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Lima [24] avaliou o espectro de atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *S.terebinthifolius* sobre cepas bacterianas e fúngicas. Segundo os resultados desta pesquisa, dentre as 11 espécies microbianas ensaiadas, oito (73%) foram sensíveis ao extrato aquoso de *S. terebentifolius* na concentração de 5000µg/mL. Porém a concentração inibitória mínima (CIM) do produto para algumas cepas foi de 2500µg/mL e, particularmente, *C. albicans* foi sensível até 1250µg/mL.

Degáspari [25] analisou a atividade antimicrobiana de extratos aquoso e alcoólico obtidos de frutos da *Schinus terebentifolius*, diretamente ligados à quantidade de compostos fenólicos existentes nesses extratos. Pelos testes, verificou-se que o extrato alcoólico apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, já o extrato aquoso não apresentou efeito inibitório sobre os crescimentos dos microrganismos testados.

Alves [26] avaliou a atividade *in vitro* da aroeira sobre microorganismos na cavidade oral, observando que o extrato hidroalcoólico desta planta apresentou atividade bactericida e bacteriostática sobre *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sobrinus*, *S. sanguis* e *L. casei*, como também ação antifúngica sobre *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Santos e colaboradores [27] realizaram um estudo avaliando a cicatrização de feridas provocadas no estômago de ratos, utilizando o extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebentifolius Raddi*). Os resultados mostraram que o uso do extrato hidroalcoólico de Aroeira não alterou o processo de cicatrização do estômago quanto à avaliação macroscópica, tensiométrica e microhistológica.

A ação cicatrizante do extrato hidroalcoólico da Aroeira em bexiga de ratos através de análise macroscópica e histológica, foi estudo por Lucena e colaboradores [16]. Os autores concluíram com este estudo que o uso de extrato hidroalcoólico de Aroeira mostrou efeito cicatrizante favorável nas cistotomias em ratos.

Soares [17] avaliou a atividade antibacteriana *in vitro* da tintura da casca da aroeira a 20% sobre *Streptococcus mutans*. Este autor observou que houve eficácia deste fitoterápico na descontaminação de escovas dentais *in vitro*.

A descoberta da radiação foi um fato bastante importante para a ciência, mas apenas quando os pesquisadores foram capazes de produzi-la artificialmente é que a valorização e aplicabilidade aumentaram. Assim, a energia nuclear passou a ser utilizada na geração de energia elétrica, medicina, indústria, agricultura e pesquisa [28].

A irradiação é o processo de aplicação desta energia a um material, tal como os alimentos e extratos vegetais, com a finalidade de esterilizá-los ou preservá-los com a inativação de microrganismos, parasitas, insetos e outras pragas [7,29,30,31,32,33,34].

A radiação gama, em doses que varia de 0.5 a 10 kGy, pode ou não desencadear mudanças físico-químicas em materiais de origem vegetal, sendo estas mudanças peculiares a cada espécie. Alguns autores [7, 35, 36, 37, 38] observaram que a radiação provocou o aumento

dos teores de flavonas, fenóis totais e taninos sem associação dose-dependente; Já outros autores [39, 40, 41] observaram que a radiação gama age diminuindo os teores de taninos. Porém, alguns estudos observaram que a radiação gama pode não influenciar os teores de fenóis e taninos, mesmo na dose de 10 kGy [42, 43]. Estas alterações podem também afetar as atividades biológicas dos vegetais, provocando uma acentuada potencialização da ação antimicrobiana de alguns extratos vegetais [7, 31, 34, 44].

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da radiação gama do  $^{60}\text{Co}$  sobre os extratos brutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, analisando a sua influência na atividade antimicrobiana de extratos obtidos de cascas e folhas.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Coleta e Preparo do Material Botânico**

As cascas e folhas de aroeira *Schinus terebinthifolius* raddi foram coletadas no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizado no Recife. A coleta apresentou quantidade suficiente para identificação, herborização, isolamento e identificação dos princípios ativos e realização dos ensaios biológicos.

Após a coleta, as cascas e folhas das árvores, foram separadas, em laboratório, por partes, e submetidas à secagem à sombra e em ambiente ventilado. Para uniformizar e acelerar o processo de secagem, todo o material foi periodicamente revolvido visando expor as áreas mais úmidas propensas ao desenvolvimento de fungos. Depois da secagem, as amostras foram trituradas em uma forrageira, para obter um material de menor granulometria.

### **2.2. Obtenção dos Extratos**

Em laboratório, as plantas foram separadas por partes e o extrato bruto das mesmas foi obtido segundo o procedimento utilizado pela comunidade, a maceração estática.

### **2.3. Irradiação dos Extratos Vegetais**

O delineamento experimental consistiu de formado 40 x 4 x 3, sendo 20 alíquotas de extrato seco de cascas, 20 alíquotas de extrato seco de folhas, irradiados nas doses 5; 7,5 e 10 kGy, além do controle, e 3 repetições, totalizando 480 amostras. Para a irradiação foi utilizado um irradiador com uma fonte de  $^{60}\text{Co}$ , com taxa de dose de 10 Gy.h<sup>-1</sup> (Cobalt Irradiator Radionics Laboratory, Scotch Plains, New Jersey, USA), pertencente ao Departamento de Energia Nuclear da UFPE.

### **2.4 Quantificação de fenóis totais e taninos**

A partir dos extratos brutos das cascas e folhas de *Schinus terebinthifolius raddi*, 500 mg foram pesados e transferidos para balões volumétricos de 50 mL, sendo solubilizados com metanol 80%, aferindo-se o volume final do balão com o referido solvente. Todos os tratamentos (irradiados e controle) foram realizados em triplicata.

As análises físico-químicas dos extratos para determinação de fenóis totais foram realizadas pelo método Folin-Ciocalteu, e os taninos totais pelo método da precipitação da caseína [45, 46]. Alterações no método foram inseridas visando à adequação aos teores de compostos fenólicos e taninos encontrados em cada espécie.

A adaptação do método Folin-Ciocalteu consistiu em adicionar 0,20 mL do extrato diluído em balão volumétrico de 100 mL contendo previamente 50 mL de água, adicionando-se 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (solução aquosa a 10%), 10 mL de solução de carbonato de sódio a 7,5% e volume completado com água destilada. A solução foi agitada e deixada em repouso por 30 minutos a temperatura e luminosidade ambiente. Após esse período, a leituras das absorbâncias foram realizadas a 760 nm. O mesmo procedimento foi adotado para as soluções-padrão de ácido tânico, nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; e 3,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

As relações entre as concentrações e as medidas de absorbância permitiram a obtenção de uma curva de calibração a qual determinou as concentrações para os fenóis totais e fenóis residuais.

Os taninos foram determinados pelo método da precipitação por proteínas (foi utilizada a caseína), que consistiu em adicionar a um erlenmeyer de 50 mL 1 g de caseína em pó e alíquotas de 5 mL do extrato, diluído em 12 mL de água, que foram mantidos sob agitação constante por três horas em temperatura e luminosidade ambiente. Depois, as amostras foram filtradas em papel-filtro Whataman de 9 cm e o volume do filtrado resultante, completado para 25 mL. Alíquotas de 5 mL, foram removidas dessa solução e os fenóis residuais, determinados pelo método Folin-Ciocalteu. A quantidade de taninos correspondeu à diferença entre o valor encontrado nessa leitura e o obtido na determinação de fenóis totais. Os fenóis totais e taninos foram expressos em teor (% p/p) de matéria seca.

Mediram-se as absorbâncias utilizando-se o Espectrofotômetro - UV-visible Hewlett Packard - HP-8453E.

## **2.5 Testes Antimicrobianos**

A determinação da atividade antimicrobiana de extratos brutos etanólicos a seco de cascas e folhas de *S. terebinthifolius* Raddi foi realizada através de experimentos, divididos em duas etapas: difusão em disco (testes qualitativos) e técnica de diluição para determinar a CIM e CMB (teste qualitativo). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.5.1 Método de difusão em Agar com disco de papel**

Para avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos extratos de *Schinus terebinthifolius* Raddi foi inicialmente aplicada a técnica de difusão em disco de papel em meio gelosado, de acordo com Bauer [47].

Discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro, foram impregnados com 10  $\mu\text{L}$  de uma solução dos extratos vegetais a 200 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de modo que cada disco ficou com a

concentração de 2.000µg/disco. Os discos foram adicionados a superfície do meio semeado e as placas incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C.

Após o período de incubação, mediu-se o diâmetro, em milímetros, dos halos de inibição do crescimento bacteriano formado em volta do disco com auxílio de uma régua milimetrada.

### 2.5.1.1 Micro-organismos Teste

Para o teste de difusão em disco, foram selecionados os micro-organismos de importância patogênica para animais e humanos pertencentes à Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, tendo como representantes de Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138). Representantes Gram-negativos: *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia marcescens* (UFPEDA 398), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39). Representantes álcool-ácido-resistente: *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71) e a levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007).

### 2.5.1.2 Padronização do inóculo

As suspensões microbianas foram padronizadas de acordo com a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ mL para bactérias e 10<sup>6</sup> UFC/mL para leveduras.

### 2.5.1.3 Meio de Cultura

Foram utilizados os meios de cultura Agar Mueller Hilton, para *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, e agar glicose extrato de levedura, para *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans*.

## 2.5.2 Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida pela menor concentração da substância antimicrobiana capaz de inibir a multiplicação microbiana. Foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com CLSI [48].

Utilizou-se microplacas estéreis com fundo em “U” contendo 96 poços enumerados de 1 a 12 na horizontal e em ordem alfabética, de A a H, na vertical. Foi preparada uma solução mãe dos extratos de *S. terebinthifolius* Raddi a 20.000 µg/mL e uma suspensão padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland dos isolados clínicos. Foram adicionados 100 µl do meio caldo Müller-Hinton, conforme o seguinte procedimento:

- Primeira coluna: foi adicionado 100 µl do caldo Müller Hinton (controle negativo);
- Segunda coluna: foi adicionado 10 µl da suspensão microbiana padronizada a 100 µl do caldo Müller Hinton (controle positivo);
- Terceira coluna: foi adicionado 180 µl do caldo Müller Hinton e 20 µL da solução mãe.

A partir desta coluna foram realizadas diluições seriadas de 1:2, retirando-se 100 µl da coluna atual para serem e adicionados na seguinte, até a décima segunda coluna. Em seguida, foram adicionados 10 µl da suspensão dos micro-organismos teste em cada poço, e, em seguida, estes conjuntos foram incubadas entre 18 horas e 24 horas. Posteriormente, foram aplicados 20 µL de um corante revelador (resazurina), para revelar a turbidez no poço.

### 2.5.3 Concentração Bactericida Mínima

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração do extrato antimicrobiano necessária para inviabilizar a célula microbiana.

Para a determinação da CBM, alíquotas de cada poço foi semeada em placa de Petri contendo o meio Agar Müeller Hinton, sendo incubadas por 18/24 h a 35 °C para posterior verificação da ausência de crescimento bacteriano.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados obtidos pelo método de difusão em disco para as atividades antimicrobianas de cascas e folhas de *S. terebinthifolius*.

No geral, os extratos de cascas e folhas de *S. terebinthifolius* apresentaram atividade antimicrobiana pronunciada contra estirpes de Gram-positivas (*S. aureus* e *M. luteus*). Sobretudo, os extratos de cascas destacam-se apresentando médias e desvios padrões maiores sobre estirpes de *S. aureus* (Tabelas 1 e 2).

Muitos autores [7, 43, 49, 50, 51, 52, 53] afirmam que a estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas são mais vulneráveis que as bactérias Gram-negativas, sendo o motivo dos agentes antimicrobianos de extratos de *S. terebinthifolius* atuarem com maior eficácia em exemplares Gram-positivas. Os trabalhos de Santos e colaboradores [7, 43] encontraram atividade antimicrobiana em extratos vegetais de cascas e folhas e atribuíram a polifenóis, em especial a presença de taninos.

A radiação gama influenciou os extratos de cascas e folhas de *S. terebinthifolius* a ponto de aumentar os potenciais antimicrobianos principalmente, sobre extratos de cascas na dose de 7.5 kGy frente a *S. aureus* (Tabelas 1 e 2). Segundo Santos e colaboradores [7] a radiação gama pode está interagindo nos extratos vegetais, a nível de metabolitos secundários, especialmente taninos, já que a atividade antimicrobiana é associada a tais princípios ativos e os mesmos encontraram aumento tanto de taninos, quanto de atividade antimicrobiana, em extratos de folhas de *A. occidentale*, após exposição ao mesmo processo físico.

**Tabela1. Atividade antimicrobiana de cascas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.**

Microorganismos	Doses de radiação gama (kGy)			
	CASCAS			
	0 (X ± δ)	5 (X ± δ)	7.5 (X ± δ)	10 (X ± δ)
<i>Staphylococcus aureus</i>	14,00± 0,00	14,67 ± 0,58	15,33 ± 0,58	12,67 ± 0,58
<i>Micrococcus luteus</i>	11,00 ± 1,00	12,33 ± 0,58	11,67 ± 0,58	11,33 ± 0,58
<i>Bacillus subtilis</i>	9,67 ± 0,58	10,00	10,00 ± 1,00	8,00
<i>Enterococcus faecalis</i>	7,67 ± 0,58	7,67 ± 0,58	7,33± 0,58	7,67± 0,58
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n.a	n.a	n.a	n.a
<i>Escherichia coli</i>	n.a	n.a	n.a	n.a
<i>Serratia marcescens</i>	n.a	n.a	n.a	n.a
<i>Mycobacterium</i>	10,33± 0,58	11,33± 0,58	9,67± 0,58	8,33± 0,58
<i>Candida albicans</i>	n.a	n.a	n.a	n.a

X → Média aritmética; δ → Desvio padrão (médias de seis ensaios); n.a → não atividade

**Tabela2. Atividade antimicrobiana de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.**

Microorganismos	Doses de radiação gama (kGy)			
	FOLHAS			
	0 (X ± δ)	5 (X ± δ)	7.5 (X ± δ)	10 (X ± δ)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,33 ± 0,58	8,33 ± 0,58	10,67 ± 0,58	11,33 ± 0,58
<i>Micrococcus luteus</i>	10,00	9,33 ± 0,58	10,33 ± 0,58	13,67 ± 0,58
<i>Bacillus subtilis</i>	7,33 ± 0,58	8,67± 0,58	8,33 ± 0,58	10,00
<i>Enterococcus faecalis</i>	n.a	9,67 ± 0,58	n.a	n.a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n.a	n.a	n.a	n.a
<i>Escherichia coli</i>	n.a	n.a	n.a	n.a
<i>Serratia marcescens</i>	n.a	n.a	n.a	n.a
<i>Mycobacterium</i>	12,33± 0,58	n.a	n.a	n.a
<i>Candida albicans</i>	n.a	n.a	n.a	n.a

X → Média aritmética; δ → Desvio padrão (médias de seis ensaios); n.a → não atividade

O extrato e micro-organismo que apresentaram melhores resultados pelo método de difusão em disco foram escolhidos para realização da CMI e CBM. Utilizaram isolados clínicos

obtidos de diferentes sítios de infecção, depositados na Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos com os seguintes registros: *Staphylococcus sp. Coagulase negativa* (UFPEDA 629); *Staphylococcus aureus* ORSA (UFPEDA 670); *Staphylococcus aureus* ORSA (UFPEDA 691); *Staphylococcus aureus* ORSA (UFPEDA 705); *Staphylococcus aureus* ORSA (UFPEDA 709); *Staphylococcus aureus* ORSA (UFPEDA 718); *Staphylococcus aureus* ORSA (UFPEDA 725); *Staphylococcus aureus* ORSA (UFPEDA 726).

A Tabela 3 demonstra as CIM e CBM dos extratos etanólicos das cascas de *S. terebinthifolius* testadas contra oito estirpes de isolados clínicos de *S. aureus*.

**Tabela 3. Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos etanólicos de cascas de *S. terebinthifolius* Raddi, oriundas de oito isolados clínicos de *S. aureus*.**

Microrganismo	DOSES							
	0kGy		5kGy		7.5 kGy		10 kGy	
	CIM µg/mL	CBM µg/mL	CIM µg/mL	CBM µg/mL	CIM µg/mL	CBM µg/mL	CIM µg/mL	CBM µg/mL
629 UPEDA	500	>2000	500	>2000	1000	>2000	1000	>2000
670 UPEDA	2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
691 UPEDA	500	2000	500	>2000	500	>2000	500	>2000
705 UPEDA	500	>2000	1000	>2000	250	>2000	500	>2000
709 UPEDA	500	2000	500	>2000	500	>2000	500	>2000
718 UPEDA	250	2000	500	2000	1000	>2000	1000	>2000
725 UPEDA	500	2000	125	2000	1000	>2000	1000	>2000
726 UPEDA	500	1000	500	>2000	500	>2000	1000	>2000

Os dados da Tabela 3 demonstram que a radiação gama interagiu em extratos de cascas de *S. terebinthifolius*. A ponto de promover atividade antimicrobiana, observada na CIM das 8 estirpes de *S. aureus*, com concentrações de: 500 µg/mL (6/8); 500 µg/mL (5/8); entre 500 µg/mL (3/8) e 1000 µg/mL (3/8) e 1000 µg/mL (4/8), respectivamente, para 0, 5, 7.5 e 10 kGy (Tabela 3). A análise individual permitiu observar que os isolados que apresentaram melhores resultados foram: 705 UPEDA (250µg/mL), 718 UPEDA (250µg/mL) e 725 UPEDA (125 µg/mL), respectivamente, nas doses de 7.5, 0 e 5 kGy.

Vale salientar que a melhor resposta a CIM de extratos de cascas de *S. terebinthifolius* ocorreu na dose de 7.5 kGy: 250 µg/mL (1/8 das estirpes de *S. aureus*). No geral, a CIM ficou entre 500 e 1000 µg/mL (3/4). Em contrapartida a pior CIM de extratos de cascas de *S. terebinthifolius* ocorreu na dose de 10 kGy, demonstrando que doses elevadas não promovem alterações em extratos de cascas de *S. terebinthifolius*, que potencializasse a atividade antimicrobiana dos mesmos. A CBM de extrato de cascas de *S. terebinthifolius*, confirmaram a CIM, atingindo a 0kGy: 1000 µg/mL (1/8) e 2000 µg/mL (1/4) e 5 kGy (2000 µg/mL (2/8) (Tabela 3).

Costerton e colaboradores [54] aborda pontos relevantes como a procedência e sensibilidade dos isolados clínicos pode influenciar na inibição dos mesmos frente a extratos vegetais. Tais fatos sugerem que características adaptativas dos isolados de diversas fontes de contaminação envolvidas na mastite bovina, de alguma forma, contribuem ou prejudicam a atuação dos extratos na inibição da multiplicação, como a produção de biofilmes pela bactéria *S. aureus* que dificulta a atuação do antimicrobiano sobre o microrganismo.

As técnicas utilizadas no trabalho não obtiveram uniformidade de resultados. A difusão em disco de papel apresentou melhor resposta na dose de 7.5 kGy, em contrapartida a microdiluição em placa, respondeu melhor nas doses de 0 kGy (75%) e 5 kGy (62.5%).

Segundo Rios; Recio [55] estudos sobre atividade antimicrobiana de materiais vegetais é comum acarretar em relevantes contradições entre os resultados obtidos por diferentes grupos e até para o mesmo autor estudando a mesma amostra, atribuindo a diferentes métodos e/ou falta de uniformidade nos critérios.

Nesse contexto, método da microdiluição em placa foi escolhido para determinação da atividade antimicrobiana dos extratos como padrão ouro, por ser mais sensível. Assim, a atividade antimicrobiana de extrato de *S. terebinthifolius* demonstrou destaque na ação contra isolados clínicos de *S. aureus*, principalmente nas doses de 0 e 5 kGy.

Alguns trabalhos como reforçam esses estudos [56, 57, 58], porém ressaltam a necessidade da realização de análises fotoquímica em matérias-primas vegetais e análises de identidade e pureza de plantas, pois a utilização de extratos padronizados centrados em grupos específicos de princípios ativos com homogeneidade química do produto, pode contribuir para melhoria da qualidade das matérias-primas vegetais e posteriormente dos medicamentos futuramente elaborados.

Os resultados encontrados neste estudo, corroboram com outras pesquisas de Santos e colaboradores [7, 43] que reconhecem a radiação gama como um processo que interage com materiais vegetais, confirmados através de bioensaios, inclusive antimicrobiano, porém não se pode padronizar uma dose que conserve e/ou aumente a atividade antimicrobiana. Visto que a radiação gama atua peculiarmente a cada espécie vegetal, conforme a sua composição química.

### 3. CONCLUSÃO

O estudo confirma que os extratos bruto de *Schinus terebinthifolius* Raddi, em especial extratos de cascas, pode ser utilizado como agente antimicrobiano, tendo o processo de irradiação gama do  $^{60}\text{Co}$ , nas doses entre 0 e 5 kGy, agido como uma importante alternativa na conservação e/ou intensificação da atividade antimicrobiana desses extratos.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradem ao CNPq pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Martorelli, S.B.F; Pinheiro, A.L.B; Souza, I.A.; Higino, J.S.; Bravo, F., “Efeito Antiinflamatório e Cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi ( aroeira) a 30% e em orabase- estudo “In vivo”, Universidade Federal de Pernambuco /Recife, Maio, 2011.
2. Lopes, C. A.; Moreno, G.; Curi, P. R.; Gottschalk, A.F.; Modolo, J. R.; Horacio, A.; Corrêa, A.; Pavan, C., “Characteristics of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovinemastitis in Brazil”, *British Veterinary Journal*, London, v. **146**:5, p. 443-8, 1990.
3. Norrby, S. R.; Nord, C. E., “Lack of development of new drugs: a potential serious threat to public health”, *Lancet Infectious Diseases*, Solna, v. **5**, p. 115-119, 2005.
4. Cohen, M. L., “Epidemiology of drug resistance: implications for apost-antimicrobial era”, *Science*, Washington, v. **257**:11, p. 1050-1055, 1992.
5. Ribeiro, A. Q.; Leite, J. P. V.; Dantas-Barros, A. M., “Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. **15**:1, p. 65-70, 2005.
6. Faiza, I.; Wahiba, K.; Nassira, G.; Chahrazed, B.; Atik, B. F., “Antibacterial and antifungal Activities of olive (*Olea europaea* L.) from Algeria”, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, v.**2**, p. 69-73, 2011.
7. Santos, G. H. F.; Silva, E. B.; Silva, B. L.; Sena, K. X. F. R.; Lima, C. S. A., “Influence of gamma radiation on the antimicrobial activity of crude extracts of *Anacardium occidentale* rich in tannins”, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*”, v. **21**:3, p. 444-449, 2011.
8. Goulart, L. S.; Teles, H. L.; Mendes, V.A.; Souza Vieira, M.C.; Moura, S.V.; Ramon, J.L.; Souza, J.M.; Souza Vieira, J.C.; Campos, E.P., “Prospecção antifúngica em *Agonandra brasiliensis*”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.**94**:3, p. 289-294, 2013.
9. Agra, M.F.; França, P.F.; Barbosa-Filho, J.M., “Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.**1**:17, p. 114-140, 2007.
10. Santos, A. B. S. da. et al. Efeito fungitóxico do óleo de nim sobre *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* e *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Revista Caatinga*, Mossoró, v. **22**:2, p. 17-22, 2009.
11. Fleig, M. 1987. Anacardiaceae. Boletim do Instituto de Biociências da UFRGS, 42: 1-70
12. Fleig, M.; Klein, R. M., 1989. Anacardiáceas. In: REITZ, R. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí : Herbário Barbosa Rodrigues. 64 p.
13. Duarte, M. R.; Toledo, M. G.; OLIVEIRA, R. B., “Diagnose morfoanatómica de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae)”, *Visão Acadêmica*, Paraná, v. **7**: 2, p. 5-13, jul./dez. 2006.
14. Soares, D.G.S.; Oliveira, C.B.; Leal, C.; Drumond, M.R.S.; Padilha, W.W.N., “Atividade Antibacteriana in vitro da Tintura de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na Descontaminação de Escovas Dentais Contaminadas pelo *S. mutans*”, *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, João Pessoa, v.**7**: 3, p.253-257, 2007.

15. Ribas, M. O., “Efeito da *Schinus terebinthifolius raddi* sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato”, *Revista Odonto Ciência*, Porto Alegre, v. **21**:53, jul./set. 2006.
16. Lucena, P.L.H.; Ribas-Filho, J.M.; Nascimento, M.M.; Czezczko, N.G.; Dietz, U.A.; Correa-Neto, M.A.; 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 bexiga de ratos”, *Acta Cir Bras*. [periódico na Internet]; **Suppl 2**, p. 46-51. Disponível em URL: <http://www.scielo./acb>, 2006.
17. Soares, D.G.S.; Oliveira, C.B.; Leal, C.; Drumond, M.R.S.; Padilha, W.W.N., “Atividade Antibacteriana in vitro da Tintura de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na Descontaminação de Escovas Dentais Contaminadas pelo *S. mutans*”, *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, João Pessoa, v. **7**:3, p.253-257, 2007.
18. Ribas, M. O. et al., “Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato”, *Revista Odonto Ciência*. Porto Alegre, v. **21**:53, p. 245-252, 2006.
19. Medeiros, K. C. P. et al., “Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: Eucalyptus globulus Labill, Peltodonradicans pohl and *Schinus terebinthifolius* Raddi in inflammatory models”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. **17**:1, p. 23-28, 2007.
20. Santos, S. C.; Mello, J. C. P. Taninos. In: Simoes, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (Eds). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Cap. 24. 2 ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. UFSC, p. 517-544, 2000.
21. Lawrence, B., “A discussion of *Schinus molle* and *Schinus terebinthifolius*”, *Perfumer & Flavorist*, v. **9**, p. 65-69, 1984.
22. Queires, L.C.S.; Rodrigues, L.E.A., “Quantificação das substâncias fenólicas totais em órgãos da aroeira *Schinus terebinthifolius* (Raddi)”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.**41**, p. 247-253, 1998.
23. Martinez, M. J.; Gonzalez, N.A.; Badell, B.J., “Actividad antimicrobiana del *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal)” *Revista Cuba Plantas Med*, v. **1**:3, p. 37-39, 1996.
24. Lima, E.O.; Pereira, F. O.; Lima, I.O.; Trajano, V.N.; Souza, E.L., “*Schinus Terebinthifolius* Raddi: Avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso”. *Infarma*, v.**16**: 7-8 (2004).
25. Degáspari, C. H.; Waszczyński, N.; Prado, M. R. M., “Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi Antimicrobial activity of *Schinus terebinthifolius* Raddi”, *Ciênc. agrotec. Lavras*, v.**29**:3, p. 617-622, 2005.
26. Alves P.M. Atividade antimicrobiana e ataderente in vitro dos extratos da *Myracrodruon urundeuva* ALL., *Malva sylvestris* e *Psidium guajava* Linn. sobre microorganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. [Dissertação]. João Pessoa: Faculdade de odontologia. Universidade Federal da Paraíba, 2005.
27. Santos, O.J.; Ribas-Filho J.M.; Czezczko, N.G.; Branco-Neto, M.L.C.; Naufel Jr, C.R.; Ferreira, L.M.; Campos, R.P.; Moreira, H.; Porcides, R.D.; Dobrowolski, S., “Avaliação do extrato de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos”, *Acta Cir Bras*, [periódico na Internet], 21, **Suppl 2**, p.39-45. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>, 2006.
28. Cardoso, E. M., “Apostila educativa: Aplicações da Energia Nuclear”, *Comissão Nacional de Energia Nuclear* (CNEN), Disponível em: [www.cnen.gov.br](http://www.cnen.gov.br), 2002.
29. Balock, J. W.; Burdittjr., A. K.; Christenson, L. D., “Effects of gamma radiation on various stages of three fruit fly species”, *Journal of Economic Entomology*, New Hampshire, v. **56**:1, p. 42-46, 1963.

30. Arthur, V.; Walder, J. M. M.; Domarco, R. E.; Wiendl, F. M.; Silva, A. C.; Leme, M. H. de A. Desinfestação de *Eugenia uvalha*, infestadas por *Anastrephafraterculus* (Wied., 1830) (Dip. Tephritidae), através da radiação gama, *Energia Nuclear e Agricultura*, Piracicaba, v. **10**:2, p.97-111, 1989.
31. Aziz, N. H.; El-Fouly, M. Z.; Abu-Shady, M. R; Moussa, L. A. A., "Effect of gamma radiation on the survival of fungal and actinomycetal florae contaminating medicinal plants", *Applied Radiation Isotopes*, Oxford., v.**48**:1, p.71-76, 1997.
32. Bennet, N.; langley, R.; Reuter, G., "The environmental impact of irradiation plants", *Radiation Physical Chemistry*, v.**52**, p.515-517, 1998.
33. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução n. 48 de 16 de março de 2004. *Diário Oficial*, Brasília, DF.53 (1): p. 39-41 (2004).
34. Satomi, L. C.; Soriani, R. R.; Pinto, T. J. A., "Descontaminação de drogas vegetais empregando irradiação gama e óxido de etileno: aspectos microbianos e químicos", *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.**41**, p.4, 2005.
35. Moussaid, M.; Lacroix, M.; Nketsia-Tabini, J.; Boubekri, C., "Phenolic compounds and the colour of oranges subjected to a combination treatment of waxing and irradiation", *Radiation Physics Chemistry*, v. **57**, p. 273-275, 2000.
36. Miranda, M. B.; Horil, J.; Alcarde, A. R., "Estudo do efeito da irradiação gama ( $^{60}\text{Co}$ ) na qualidade da cachaça e no tonel de envelhecimento", *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.**26**:4, p.772-778, 2006.
37. Bhat, R.; Sridhar, K. R.; Tomita-Yokotani, K. Effect of ionizing radiation on antinutritional features of velvet bean seeds (*Mucuna pruriens*), *Food Chemistry*, v. **103**, p. 860-866, 2007.
38. Stajner, D.; Milosevic, M.; Popovic, B. M., "Irradiation Effects on Phenolic Content, Lipid and Protein Oxidation and Scavenger Ability of Soybean Seeds", *International Journal of Molecular Sciences*, v. **8**, p. 618-627, 2007.
39. Villavicencio, A. L. C. H.; Mancini-Filho, J.; Delincée, H.; Greiner, R., "Effect of irradiation on anti-nutrients (total phenolics, tannins and phytate) in Brazilian beans", *Radiation Physics Chemistry*, v.**57**, p. 289-293, 2000.
40. Brigide, P.; Canniatti-Brazaca, S. G., "Antinutrients and "in vitro" availability of iron in irradiated common beans (*Phaseolus vulgaris*)", *Food Chemistry*, v.**98**, p.85-89, 2006.
41. Toledo, T. C. F.; Canniatti-Brazaca, S. G.; Arthur, V.; Piedade, S. M. S., "Effects of gamma radiation on total phenolics, trypsin and tannin inhibitors in soybean grains", *Radiation Physics and Chemistry*, v.**76**, p.1653-1656, 2007.
42. Koseki, P. M.; Villavicencio, A. L. C. H.; Brito, M. S.; Nahme, L. C.; Sebastião, K. I.; Rela, P. R.; Almeida-Muradian, L. B.; Mancini-Filho, j.; Freitas, P. C. D., "Effects of irradiation in medicinal and eatable herbs", *Radiation Physics and Chemistry*., v.**63**, p.681-684, 2002.
43. Santos, G.H.F.; Silva, E.B.; Sena, K.X.F.R.; Silva, B.L.; Lima, C.S.A., "The influence of  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation on the action of phenolic compounds of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the microbiological control of crude extracts", *Intern. J. Low Radiat.*, v.**7**, p. 223-235, 2010.
44. Mechi, R.; Caniatti-Brazaca S.G.; Arthur, V., "Avaliação química, nutricional e fatores antinutricionais do feijão preto (*Phaseolusvulgaris*L.) irradiado", *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.**25**:1, 2005.
45. Folin, O.; Ciocalteu, V., *Journal of Biological Chemistry*, v. **73**, 1927. 424p.
46. Queiroz, C. R. A. A.; Morais, S. A. L.; Nascimento, E. A., "Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*)", *Revista Árvore*, v. **26**: 4, p. 485 - 492, 2002.

47. Bauer, A. M.; Kirby, M. N.; Sherris, J. C., “Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk methods”, *American Journal of Clinical Pathology*, **v.45**, p. 493-494, 1966.
48. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Document: M100 – S20, **v. 30**:1, Replaces M100 – S19. 19 (3), 2010.
49. Nostro, A.; Germano, M. P.; D’angelo, V.; Marino, A.; Cannatelli, M. A., “Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity”, *Letters in Applied Microbiology*, **v.30**, p.379–384, 2000.
50. Srinivasan, D.; Nathan, S.; Suresh, T.; Perumalsamy, P.L., “Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine”, *Journal of Ethnopharmacology*, **v.74**:3, p.217-220, 2001.
51. Hodges, N., “Pharmaceutical applications of microbiological techniques. In: Aulton, M.E. (Ed.)”, *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, 2nd ed. Harcourt Publishers Limited, London, p. 606, 2002.
52. Loguercio, A. P.; Battistin, A.; Vargas, A. C.; Henzel, A.; Witt, N. M., “Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico das folhas de jambolão (*syzygium cumini* (L.) Skells)”, *Ciência Rural*, Santa Maria, **v.35**:2, p.371-376, 2005.
53. Tadeg, H.; Mohammed, E.; Asres, K.; Gebre-Mariam, T., “Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders”, *Journal of Ethnopharmacology*, **v. 100**, p. 168–175, 2005.
54. Costerton, J. W.; Stewart, Philip S., “Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections”, *Science*, **v. 284**, p. 1318-1322, 1999.
55. Rios, J. L.; Recio, M.C., “Medicinal plants and antimicrobial activity”, *Journal of Ethnopharmacology*, **v.100**:1-2, p. 80-84, 2005.
56. Calixto, J.B., “Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. Ribeirão Preto, **v.33**:2, p. 179-189, 2000.
57. Capasso, R.; Izzo, A.A.; Pinto, L., “Phytotherapy and quality of herbal medicines”, *Fitoterapia*, **v.71**, p.58-65, 2000.
58. Bara, M.T.F.; Ribeiro, P.A.M.; Arantes, M.C.B., “Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **v.16**:2, 2006.