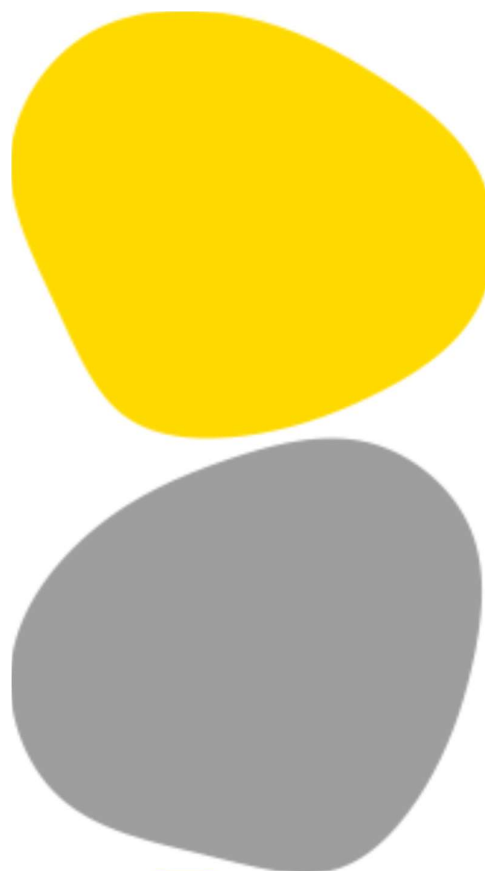




# Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de resíduos da indústria da castanha

Miriam da Silva Santiago

12/2024





**Avaliação da atividade antibacteriana  
de extratos de resíduos da indústria da castanha**

**Autor**

Miriam da Silva Santiago

**Orientadores**

Professora Doutora Valentina Fernandes Domingues,  
REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Instituto Politécnico do Porto (IPP)

Professora Doutora Patrícia Carla dos Santos Correia,  
REQUIMTE/LAQV, Escola Superior de Saúde (E2S), Instituto Politécnico do Porto (IPP)

*Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de Mestre em **Farmácia** – Área de  
Especialização em **Tecnologia do Medicamento e de Produtos de  
Saúde** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto*



## **Agradecimentos**

Agradeço a toda equipa do Instituto Superior de Engenharia do Porto que me proporcionou em realizar este trabalho laboratorial nas suas Instalações.

Não poderia deixar de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Valentina Domingues e à Professora Doutora Patrícia Correia pela orientação pedagógica.

Aos meus irmãos, por terem demonstrado apoio e suporte, por todo o cuidado, amor e preocupação.

As minhas amigas Célia Maria, Anabela Cunha e Anabela Raquel Cardoso, pelas conversas e companhias.

Ao meu tio Inagilson Ferreira, pelo todo apoio, preocupação e amor.

Por tudo isto e muito mais, a todos, o meu sincero agradecimento.



## Resumo

A indústria da castanha gera uma quantidade significativa de resíduos, como casca e ouriço, que podem conter vários compostos bioativos com potencial antimicrobiano. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de extratos de resíduos de castanha (ouriço e casca) contra várias estirpes bacterianas. Prepararam-se extratos por extração subcrítica e liofilização, que foram posteriormente dissolvidos em meio Muller-Hinton a diferentes concentrações. A atividade antimicrobiana foi avaliada através de diluições seriadas e contagem de Unidades Formadoras de Colónias após incubação a 36 °C por 24 horas. Obtiveram-se Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI), com o extrato de casca e de ouriço, respetivamente, de 36 mg/mL e 18 mg/mL, para *Staphylococcus epidermidis*, e de 27 e 36 mg/mL, para *Serratia marcescens*. No caso das estirpes *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* obteve-se uma CMI de 18 mg/mL para ambos os extratos, bem como para a *Pseudomonas aeruginosa*, com CMI menor do que 6 mg/mL. Conclui-se que os resíduos da castanha têm potencial como fontes de compostos antibacterianos, com aplicações promissoras na indústria alimentar e farmacêutica. Futuros estudos são necessários para isolar os compostos ativos e avaliar a toxicidade.

**Palavras-chave:** extratos vegetais; antimicrobianos; resíduos da castanha; atividade antibacteriana



## Abstract

The chestnut industry generates a significant amount of waste, such as shells and shells, which may contain several bioactive compounds with antimicrobial potential. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of chestnut residue extracts (hedgehog and bark) against various bacterial strains. The extracts were prepared by subcritical extraction and lyophilization, which were subsequently dissolved in Muller-Hinton medium at different concentrations. Antimicrobial activity was evaluated through serial dilutions and counting of Colony Forming Units after incubation at 36 °C for 24 hours. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) were obtained with the bark and hedgehog extract, respectively, of 36 mg/mL and 18 mg/mL, for *Staphylococcus epidermidis*, and 27 and 36 mg/mL, for *Serratia marcescens*. In the case of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains, a MIC of 18 mg/mL was obtained for both extracts, as well as for *Pseudomonas aeruginosa*, with a MIC of less than 6 mg/mL. It is concluded that chestnut residues have potential as sources of antibacterial compounds, with promising applications in the food and pharmaceutical industries. Future studies are needed to isolate active compounds and evaluate toxicity.

**Keywords:** plant extracts; antimicrobials; chestnut residues; antibacterial activity



## Índice

<b>1.</b>	Introdução.....	1
<b>1.1.</b>	A importância <i>Castanea sativa</i> Mill em Portugal.....	1
<b>1.1.1.</b>	Aplicações potenciais nas indústrias alimentar e farmacêutica.....	2
<b>1.2.</b>	Plantas com atividades antibacterianas.....	3
<b>1.3.</b>	Testes de avaliação da atividade antibacteriana.....	14
<b>1.3.1.</b>	Métodos de difusão.....	14
<b>1.3.1.1.</b>	Método de difusão em disco de agar.....	14
<b>1.3.1.2.</b>	Método de difusão em poço de agar.....	15
<b>1.3.1.3.</b>	Método de difusão em tampão de agar.....	15
<b>1.3.2.</b>	Método de gradiente antimicrobiano ( <i>Etest</i> ).....	15
<b>1.3.3.</b>	Método de listras cruzadas.....	16
<b>1.3.4.</b>	Métodos de diluição.....	16
<b>1.3.4.1.</b>	Método de diluição em caldo.....	16
<b>1.3.4.2.</b>	Método de diluição em agar.....	17
<b>1.3.5.</b>	Teste de eliminação de tempo ( <i>time-kill</i> ).....	18
<b>1.3.6.</b>	Ensaio de bioluminescência de Adenosina Trifosfato.....	19
<b>1.3.7.</b>	Método citofluorométrico de fluxo.....	19
<b>1.4.</b>	Problemática.....	20
<b>1.5.</b>	Objetivos.....	21
<b>2.</b>	Métodos.....	22
<b>2.1.</b>	Matérias-primas e Espécies bacterianas.....	24
<b>2.2.</b>	Análise dos extratos.....	24
<b>3.</b>	Resultados e discussão.....	26
<b>3.1.</b>	Avaliação da <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	26
<b>3.2.</b>	Avaliação da <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
<b>3.3.</b>	Avaliação da <i>Escherichia coli</i> .....	30
<b>3.4.</b>	Avaliação da <i>Serratia marcescens</i> .....	31
<b>3.5.</b>	Avaliação da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
<b>4.</b>	Conclusão.....	37
	Referências Bibliográficas.....	46
	Anexos.....	53



## Índice de Figuras

Figura 1: <i>C. Sativa Mill (castanha doce) – Frutos espinhosos e folhas dentadas de C. Sativa Mill</i> ....	1
Figura 2: Representação das microplacas utilizadas .....	23
Figura 3 – Resultado de diluições dos poços da microplaca .....	43
Figura 4 – Outros resultados de diluições dos poços da microplaca .....	43
Figura 5 – Incubação das placas de Petri .....	44
Figura 6 – Resultado de UFC contáveis usados com o ouriço .....	45
Figura 7 – Resultados do UFC contáveis usados com controlo de MH .....	45



## Índice de tabelas

Tabela 1. Lista de algumas plantas com ou sem atividade bacteriana .....	9
Tabela 2. Número de UFC obtidas de <i>S. epidermidis</i> em concentrações crescentes de extrato de casca de castanha e de extrato de ouriço de castanha .....	25
Tabela 3. Número de UFC obtidas de <i>S. aureus</i> em concentrações crescentes de extrato de casca de castanha e de extrato de ouriço de castanha .....	27
Tabela 4. Número de UFC obtidas de <i>E. coli</i> em concentrações crescentes de extrato de casca de castanha e de extrato de ouriço de castanha .....	28
Tabela 5. Número de UFC obtidas de <i>S. marcescens</i> em concentrações crescentes de extrato de casca de castanha e de extrato de ouriço de castanha .....	31
Tabela 6. Número de UFC obtidas de <i>P. aeruginosa</i> em concentrações crescentes de extrato de casca de castanha e de extrato de ouriço de castanha .....	33



## Nomenclatura e glossário

Acácia-branca: *Moringa oleífera*

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*)

Agrimónia: *Agrimonia eupatoria*

ATCC: Coleção de Culturas Tipo Americana

Camomila-vulgar: *Matricaria chamomilla*

Canela: *Cinnamomum zeylanicum*

Castanha: *Castanea sativa* Mill (*C. sativa*)

Castanha-da-América: *Castanea dentata*

Castanha-da-China: *Castanea mollissima* e *Castanea seguinii*

Castanha-do-Japão: *Castanea crenata*

Citronela: *Cymbopogon nardus*

Cravo-da-índia: *Caryophyllus aromaticus*

CMI: Concentração Mínima Inibitória

EAE: Extrato Etanólico de gel de folha de *Aloe vera*

Erva-cideira: *Melissa officinalis*

*Escherichia coli* (*E. coli*)

Gesho: *Rhamnus prinoides* (*R. prinoides*)

Hipericão: *Hypericum polygonifolium*

*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)

Limão-cravo: *Citrus limonia*

Lírio: *Lilium armenum*,

MH: *Muller Hinton Broth*

Penicilina: *Alternanthera brasiliana*

Pimpinela: *Sanguisorba officinalis*

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)

Quebra-pedra: *Phyllanthus niruri*

Ruibarbo-selvagem: *Rumex obtusifolius*

Sálvia-comum: *Salvia officinalis* (*S. officinalis*)

Segurelha-das-montanhas: *Satureja montana* (*S. montana*)



*Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar *Typhimurium* (*S. enterica* sorovar *Typh*)

*Serratia marcescens* (*S. marcescens*)

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

*Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*)

SOD: Extrato Bruto

SODD: Fração do Extrato Bruto de Diclorometano

SODH: Fração Solúvel em n-Hexano

Tanchagem: *Plantago major*

UFC: Unidades Formadoras de Colónias

Uva ursina: *Arctostaphylos uva-ursi* (*A. uva-ursi*)



## 1. Introdução

### 1.1. A importância *Castanea sativa* Mill em Portugal

O castanheiro é uma árvore que pertence ao género *Castanea* e à família *Fagaceae*. As diferentes espécies do género *Castanea* encontram-se em várias regiões do mundo, incluindo a Castanha-da-China (*Castanea mollissima* e *Castanea seguini*), a Castanha-do-Japão (*Castanea crenata*), a Castanha-da-América (*Castanea dentata*) e a Castanha-da-Europa, Castanha-Portuguesa (*Castanea sativa* Mill) conforme destacado na figura 1 (Santos et al., 2022).



Figura 1: *Castanea sativa* Mill – Frutos espinhosos e folhas dentadas

Os principais componentes químicos são as saponinas triterpénicas, que constituem até 10% da planta e são conhecidas como escinas. A escina existe em três formas:  $\alpha$ -escina,  $\beta$ -escina e  $\gamma$  escina (criptoescina), cada uma com propriedades físicas distintas. A  $\beta$ -escina é uma mistura de mais de 30 glicosídeos diferentes derivados das agliconas triterpénicas protoaescigenina e barringtogenol. Além disso, a planta contém flavonoides, como quercetina e canferol, e suas formas glicosiladas (Santos et al., 2022).

As castanhas são uma adição antiga e recomendada à dieta humana devido à sua composição nutricional. São ricos em água, amido, proteínas, fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes. A sua qualidade nutricional depende de fatores como o cultivo, as condições ambientais e as práticas de produção. As castanhas são pobres em gordura e colesterol, tornando-as uma fonte saudável de energia. Também contém açúcares que influenciam o seu sabor e são afetados pelas condições de armazenamento. Além disso, as castanhas são pobres em gordura, ricas em vitamina C, minerais e têm atividade antioxidante. O processamento de castanhas, como torrar ou cozinhar, afeta sua composição, com variações na quantidade de



proteínas, fibras e outros componentes. As castanhas cozidas são uma boa fonte de compostos fenólicos e ácidos orgânicos, com benefícios para a saúde (Santos et al., 2022).

Os polifenóis são compostos bioativos com propriedades antioxidantes que podem ser usados em alimentos como aditivos para melhorar características como cor, amargor e adstringência, bem como proteger contra processos oxidativos. Eles são produzidos pelas plantas como um mecanismo de defesa em ambientes agressivos. Os polifenóis encontrados nas cascas de sementes de frutos (CSS) são especialmente ricos, incluindo elagitaninas, taninos condensados, ácidos fenólicos e flavonoides, sendo os taninos a classe predominante. Estes compostos podem variar em quantidade em diferentes amostras de CSS. Análises precisas revelaram a presença de elágicos, gálicos, catequina, epicatequina e outros polifenóis em extratos de CSS. A composição específica pode variar em função das partes das sementes e dos métodos de extração utilizados (Santos et al., 2022).

As cascas de castanha contêm vitamina E, um antioxidante lipossolúvel que desempenha um papel importante na defesa antioxidante celular. Os níveis de vitamina E podem variar devido às diferenças climáticas em diferentes regiões. As cascas de castanha são utilizadas para compostagem como prática agrícola sustentável, mas existe um interesse crescente na utilização destas cascas como fontes de ingredientes bioativos nas indústrias alimentar e nutracêutica devido à sua disponibilidade e baixo custo. Os nutracêuticos são compostos bioativos que têm efeitos positivos na saúde humana e estão em alta demanda hoje (Santos et al., 2022).

### **1.1.1. Aplicações potenciais nas indústrias alimentar e farmacêutica**

O potencial das cascas de castanha é um recurso renovável e subutilizado. Atualmente são utilizados para a compostagem como prática sustentável de eliminação de resíduos agrícolas. No entanto, existe um interesse crescente na utilização de cascas de castanha nas indústrias alimentar e nutracêutica devido ao seu elevado potencial antioxidante e outros benefícios para a saúde (Pinto et al., 2021).

Eles contêm uma variedade de compostos bioativos, que têm propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, tornando-os valiosos para a indústria alimentar e farmacêutica. Eles podem ser usados como ingredientes em suplementos dietéticos, alimentos funcionais e produtos farmacêuticos (Pinto et al., 2021).



Além disso, as cascas de castanha podem ser uma fonte de matéria-prima para a produção de biocombustíveis, aproveitando os seus hidratos de carbono fermentáveis. A extração de polifenóis e outros compostos bioativos do ouriço também pode ser realizada para uso em alimentos como conservantes naturais (Pinto et al., 2021).

Em suma, as cascas de castanha têm um elevado potencial como fonte de ingredientes bioativos com várias aplicações nas indústrias alimentar, farmacêutica e energética, enquanto promovem a sustentabilidade e reduzem o desperdício (Pinto et al., 2021).

Também tem uma longa história de cultivo, sendo fundamental na alimentação em períodos de escassez de recursos alimentares. É uma espécie multifuncional, com notável biodiversidade e adaptabilidade a diferentes ecossistemas. A sua produção tem aumentado globalmente devido ao reconhecimento das suas qualidades nutricionais e benefícios para a saúde. Em Portugal, em 2021, foi o principal produtor de castanhas da Europa, representando cerca de 35,7% da produção europeia, com 50,37 mil toneladas produzidas (Santos et al., 2022).

## 1.2. Plantas com atividades antibacterianas

Em 2014, foi realizado o estudo de caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais (OEs) de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*). Observou-se que os óleos essenciais das plantas segurelhadas-montanhas (*Satureja montana*), citronela (*Cymbopogon nardus*) e limão-cravo (*Citrus limonia*) foram caracterizados quimicamente e sua Concentração Mínima Inibitória (CMI) sobre as bactérias da Coleção de Culturas Tipo Americana (ATCC) *S. aureus* ATCC 2592 e *E. coli* ATCC 25922 foi determinada. A CMI dos óleos testados contra *E. coli* e *S. aureus* foi de 1,5%, exceto para o óleo essencial de *S. montana* sobre *S. aureus*, onde a sensibilidade a este óleo foi observada a partir da concentração de 5,0%. Em relação à constituição química, os componentes majoritários dos óleos de *S. montana*, *C. nardus* e *C. limonia* foram, respetivamente, o timol, citronelal e limoneno. Os OEs demonstraram atividade antibacteriana em testes, com destaque para o óleo essencial de limão, que apresentou maior eficácia contra *S. aureus*, e o óleo de *S. montana*, que foi mais eficaz contra *E. coli*. Esses resultados sugerem que esses óleos podem ser considerados como alternativas promissoras aos antimicrobianos e conservantes sintéticos, com base nos testes realizados *in vitro* (Millezi et al., 2014).

Em 2014 avaliou-se a atividade antibacteriana de extratos obtidos a partir das flores da planta camomila-vulgar (*Matricaria chamomilla*), com foco nas bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa*,



*E. coli* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar *Typhimurium* (*S. enterica* sorovar *Typhi*). Os pesquisadores prepararam dois tipos de extratos: um utilizando ciclohexano como solvente e outro utilizando etanol. Em seguida, eles testaram a atividade desses extratos contra as bactérias mencionadas. Os resultados indicaram que o extrato bruto obtido com ciclohexano não demonstrou atividade antibacteriana em nenhuma das bactérias testadas. Por outro lado, o extrato etanólico mostrou eficácia apenas contra *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), não apresentando efeito bacteriostático contra *S. aureus*, *E. coli* e *S. enterica* sorovar *Typhi*. Esses resultados sugerem que, embora o extrato etanólico tenha mostrado alguma atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa*, ele não foi eficaz contra as outras bactérias testadas. Além disso, o extrato bruto de ciclohexano não apresentou atividade antibacteriana em nenhuma das bactérias, indicando que o solvente pode não ter extraído compostos ativos com propriedades antibacterianas da planta. O estudo indica que a camomila pode ter potencial como agente antibacteriano, especialmente contra *P. aeruginosa*, mas são necessárias mais investigações para compreender melhor os mecanismos envolvidos e identificar os compostos responsáveis por essa atividade (Carvalho et al., 2014).

Em 2016, após realização do estudo feito para a avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* das frações solventes das folhas de gesho, *Rhamnus prinoides* (*R. prinoides*), contra bactérias patogênicas *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *S. enterica* sorovar *Typhi*, verificou-se que as frações metanólicas e clorofórmio demonstraram atividade antibacteriana significativa contra o crescimento de bactérias patogênicas, mas a fração aquosa não revelou atividade antibacteriana contra nenhuma das bactérias testadas (Molla et al., 2016).

Em 2016, foi feito o estudo para a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólico e hexânico do caule de erva-cidreira (*Melissa officinalis*). Ambos os extratos apresentaram CMI  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$  contra *E. coli* e *S. aureus*. Extrato metanólico mostrou efeito potencializador da gentamicina contra *E. coli* e *S. aureus*, enquanto em combinação com amicacina, ocorreu antagonismo contra *S. aureus*. O extrato hexânico reduziu a CMI da amicacina e gentamicina contra estripes de *E. coli*, mas demonstrou efeito antagônico com a amicacina contra *S. aureus* (Sousa et al., 2016).

Em 2017, realizou-se o estudo da atividade antimicrobiana de alguns materiais vegetais utilizados na medicina tradicional da Armênia. A atividade antimicrobiana foi avaliada em várias estripes bacterianas e leveduras). Com extratos de cinco plantas (agrimônia ou *Agrimonia eupatoria*, hipericão ou *Hypericum polygonifolium*, lírio ou *Lilium armenum*, ruibarbo-selvagem



ou *Rumex obtusifolius*, e pimpinela ou *Sanguisorba officinalis*) onde extratos brutos dessas plantas mostraram eficácia contra pelo menos quatro estripes de microrganismos testados, na concentração de 500 µg ml<sup>-1</sup>. Os extratos de acetona e hexano de uma espécie de hipericão, o *Hypericum alpestre*, assim como o extrato acetona de sálvia comum (*Salvia officinalis*), foram capazes de inibir o crescimento de *P. aeruginosa*, mesmo em concentrações de 64 µg mL<sup>-1</sup>. Adicionalmente, os extratos de clorofórmio e acetona de *S. officinalis* também demonstraram atividade contra *P. aeruginosa*, com eficácia mantida até 256 µg mL<sup>-1</sup>. Foi observado que a acetona foi o solvente mais eficaz para a solubilização de compostos antimicrobianos em quase todas as plantas testadas (Ginovyan et al., 2017).

Esses resultados sugerem que algumas das plantas medicinais tradicionais da Arménia têm potencial antimicrobiano significativo, com concentrações bacteriostáticas/bactericidas mínimas bastante baixas. Portanto, essas plantas merecem estudos mais aprofundados para explorar seu potencial terapêutico (Ginovyan et al., 2017).

Em 2019, realizou-se o teste de difusão em disco e diluição em caldo para avaliação da atividade antibacteriana de extratos aquosos e etanólicos de gemas de Cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) contra três patogênicos alimentares comuns: *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os extratos aquosos e etanólico demonstraram atividade inibitória contra os patógenos testados. Concentrações de 500 µg/mL e superiores do extrato aquoso e etanólico inibiram o crescimento de *S. aureuse E. coli*, enquanto concentrações de 700 µg/mL e superiores foram eficazes contra *P. aeruginosa*. No método de difusão em disco, observou-se que *S. aureus* foi mais suscetível ao extrato aquoso, enquanto *P. aeruginosa* foi mais sensível ao extrato etanólico. Os CMIs do extrato aquoso foram geralmente menores que as do extrato etanólico, exceto para *S. aureus*, onde foram semelhantes. Comparativamente, os CMIs dos extratos foram maiores do que os da Gentamicina, um antibiótico padrão. Em suma, o estudo demonstrou que os extratos aquosos e etanólico de Cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) possuem efeitos antibacterianos contra patógenos alimentares, mostrando potencial para aplicação na prevenção ou tratamento de infecções causadas por esses microrganismos (Mostaqim et al., 2019).

Em 2019, avaliou a atividade antibacteriana do extrato etanólico da casca de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) contra *S. aureus* e *E. coli*, dois patógenos de origem alimentar. O método utilizado foi a difusão em disco, testando diferentes concentrações dos extratos de especiarias. A canela mostrou atividade inibitória contra ambos os patógenos, sendo mais eficaz contra *S. aureus* do que contra *E. coli*. A maior zona de inibição foi de 26 mm para ambos os



patógenos. Comparado com o antibiótico padrão Amicacina, o extrato etanólico produziu uma zona de inibição mais ampla para ambos os organismos de teste. Em suma, o estudo concluiu que o extrato etanólico de canela possui um efeito antimicrobiano significativo contra esses patógenos de origem alimentar (Salma et al., 2019).

Em 2019, investigou-se o efeito antibacteriano do extrato etanólico de gel de folha de *Aloe vera* (EAE) contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Foram utilizadas cinco concentrações diferentes do extrato (100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL), e foi observado um efeito inibitório dose-dependente contra as quatro espécies avaliadas. Os resultados mostraram que o EAE possui atividade antibacteriana contra esses patógenos. No entanto, são necessários mais estudos para identificar os ingredientes ativos responsáveis por esse efeito e potencialmente desenvolver novos agentes antimicrobianos baseados na *Aloe vera* (Haque et al., 2019).

A avaliação da atividade antibacteriana de plantas medicinais de uso popular: *Alternanthera brasilian* (penicilina), *Plantago major* (tanchagem), *Arctostaphylos uva-ursi* (uva-ursina) e *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra), com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana de plantas medicinais, frente a diferentes espécies de bactérias, bem como analisar seus perfis cromatográficos. Este estudo investigou a relação entre o uso popular de plantas medicinais, sua atividade antibacteriana *in vitro* e seu perfil fitoquímico. Os resultados revelaram que não há uma correlação direta entre o uso tradicional das plantas e sua eficácia antibacteriana *in vitro*. Embora algumas espécies vegetais sejam conhecidas popularmente por suas propriedades antibacterianas, muitas delas mostraram-se inativas contra as estripes bacterianas testadas neste estudo. Um achado significativo foi a constatação de que a espécie *A. brasiliana*, apelidada popularmente de "penicilina" devido à sua associação com a classe de antibióticos β-lactâmicos, não apresentou atividade antibacteriana contra as estripes bacterianas testadas *in vitro*. Isso destaca a desconexão entre o conhecimento tradicional e a eficácia real da planta como agente antibacteriano. Além disso, a fração em acetato de etilo obtida de *Arctostaphylos uva-ursi* demonstrou uma notável atividade contra *S. aureus*, uma bactéria patogénica comum. Embora a literatura sugira que essa atividade esteja relacionada à presença de certos compostos, como arbutina e hidroquinona, esses compostos não foram detetados na análise cromatográfica. Isso sugere a presença de outros compostos na planta que podem ser responsáveis por sua atividade antibacteriana, destacando a complexidade dos mecanismos de ação das plantas medicinais (Spézia et al., 2020).



Em 2020, avaliou-se a atividade antibacteriana da *Salvia officinalis* L. contra periodontopatógenos: um estudo *in vitro*. Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana de diferentes extratos e compostos derivados de *S. officinalis* contra bactérias associadas à doença periodontal. Os resultados mostraram que o extrato bruto (SOD) e algumas frações do extrato bruto de diclorometano (SODD), subfração do extrato de diclorometano solúvel em diclorometano (SODD1), e fração solúvel em n-hexano (SODH) apresentaram atividade moderada contra as bactérias testadas. O componente manool que é a substância pura destacou-se, mostrando ação significativa contra várias estripes bacterianas, especialmente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Além disso, foi observado que o manool teve efeito inibitório e bactericida contra *A. actinomycetemcomitans* em concentrações baixas (25 µg/mL). O estudo também abordou a atividade antibiofilme, destacando a importância de considerar não apenas as células planctônicas, mas também a formação de biofilme pelas bactérias. A análise revelou que algumas amostras reduziram significativamente a contagem bacteriana e a formação de biofilme. Além disso, foram investigadas possíveis combinações sinérgicas entre os compostos testados e a clorexidina, um antimicrobiano padrão. Os resultados sugeriram que algumas combinações apresentaram efeitos sinérgicos ou aditivos contra as estripes bacterianas testadas. Concluiu-se que o manool e a subfração do extrato de diclorometano solúvel em n-hexano do SODH (SODH1) são promissores como agentes antimicrobianos contra patógenos da doença periodontal, indicando a necessidade de pesquisas adicionais sobre esses compostos (Mendes et al., 2020).

Em 2020, foi realizado um estudo para avaliar o perfil fenólico de subprodutos da *C. sativa* Mill e sua atividade antioxidante e antimicrobiana contra bactérias multirresistentes. A indústria da castanha gera uma grande quantidade de subprodutos, e esses resíduos são fontes potenciais de compostos fenólicos com alto potencial bioativo. Os extratos etanólicos de diferentes subprodutos (casca de castanha, ouriço e folhas) foram analisados por Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV e espectrometria de massas por ionização em *electrospray*. Os principais compostos fenólicos identificados foram trigalloyl-HHDP-glicose, ácido gálico, quercetina e glicosídeos de miricetina. A atividade antimicrobiana foi avaliada contra 10 estripes bacterianas. O extrato da casca foi o mais eficaz, suprimindo o crescimento de 6 das 10 bactérias testadas, especialmente *Staphylococcus epidermidis*, que foi suscetível a todos os extratos. Nenhum dos extratos foi eficaz contra *E. coli* e *S. enterica* sorovar *Typhi*. O estudo concluiu que os subprodutos da castanha são fontes promissoras de compostos fenólicos com atividades



antioxidantes e antimicrobianas, sugerindo sua potencial aplicação como coadjuvantes em tratamentos antibióticos e como aditivos antioxidantes, valorizando os subprodutos dentro de uma abordagem de economia circular (Silva et al., 2020).

Em 2022, avaliou-se a atividade antimicrobiana de folhas e sementes de acácia-branca (*Moringa oleífera*). Foram testados extratos polares e apolares, apenas os extratos apolares das sementes demonstraram inibição dose-dependente contra *S. aureus* e *S.epidermidis*. Isso foi atribuído ao teor de ácidos gordos, notavelmente diferente nos dois tipos de extratos apolares. Esses resultados sugerem um potencial biológico significativo da planta, destacando a importância de futuros estudos para explorar mais a fundo suas propriedades (Anzano et al., 2022).

A tabela 1 apresenta os estudos de algumas plantas com ou sem atividades antibacterianas.



Tabela 1. Lista de algumas plantas com ou sem atividade bacteriana.

Referência bibliográfica	Plantas <i>Espécie</i> (parte)	Extratos (solvente)	Atividade antibacteriana	Bactérias
(Carvalho et al., 2014)	<i>M. chamomilla</i> L. (flores)	Etanol	Sem atividade	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. enterica subsp. enterica</i> sorovar <i>Typhimurium</i> .
			Com atividade	<i>P. aeruginosa</i>
		Ciclohexano	Sem atividade	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. enterica subsp. enterica</i> sorovar <i>Typhimurium</i> .
(Millezi et al., 2014)	<i>S. montana</i> L. (folhas)	Dimetilsufóxido (DMSO)	Com atividade	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>
	<i>C. nardus</i> L. (folhas)			
	<i>C. limonia</i> Osbeck (cascas)			
(Sousa et al., 2016)	<i>M. officinalis</i> L. (caule)	Metanólico e Hexânico	Com atividade	<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>
(Molla et al., 2016)	<i>R. prinoides</i> L'Herit (folhas)	Metanol	Com atividade	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogen</i> , <i>S. pneumoniae</i> e <i>S. enterica subsp. enterica</i> sorovar <i>Typhimurium</i> .
		Clorofórmio	Com atividade	
		Água destilada	Sem atividade	
(Ginovyan et al., 2017)	<i>A. eupatoria</i> L. (planta inteira)	Água destilada, metanol, clorofórmio, acetona e hexano	Com atividade	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica subsp. enterica</i> sorovar <i>Typhimurium</i> . e <i>S. aureus</i>
	<i>H. polygonifolium</i> (parte aérea)		Sem atividade	
	<i>L. armenum</i> (bulbo)		Com atividade	
	<i>R. obtusifolius</i> L. (sementes)		Com atividade	
	<i>S. officinalis</i> L. (parte aérea)		Com atividade	



Tabela 1. Lista de algumas plantas com ou sem atividade bacteriana (continuação).

Referência bibliográfica	Plantas <i>Espécie</i> (parte)	Extratos (solvente)	Atividade antibacteriana	Bactérias
(Mostaqim et al., 2019)	<i>S. aromaticus</i> (botões florais)	Água destilada e etanol	Com atividade	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> .
(Salma et al., 2019)	<i>C. zeylanicum</i> ((canela)casca)	Etanol	Com atividade	<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>
(Haque et al., 2019)	<i>A. vera</i> (gel de folha)	Etanol	Com atividade	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , e <i>K. pneumoniae</i>
(Spézia et al., 2020)	<i>A. uva-ursi</i>	Solução hidroalcoólica; Diclorometano; N-butanol; Água destilada	Sem atividade	<i>S. aureus</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>K. pneumoniae</i>
		Acetato de etilo	Com atividade	<i>S. aureus</i>
	<i>A. brasiliana</i> (partes aéreas)	Solução hidroalcoólica; Diclorometano; Acetato de etilo; N-butanol; Água destilada	Sem atividade	<i>S. aureus</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>M. hominis</i> , <i>E. coli</i> , <i>U. urealyticum</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>K. pneumoniae</i>
	<i>P. major</i>		Com atividade	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> ,
	<i>Phyllanthus niruri</i>		Sem atividade	<i>P. aeruginosa</i> e <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorovar <i>Typhimurium</i> .



Tabela 1. Lista de algumas plantas com ou sem atividade bacteriana (continuação).

Referência bibliográfica	Plantas <i>Espécie</i> (parte)	Extratos (solvente)	Atividade antibacteriana	Bactérias
(Mendes et al., 2020)	<i>S. officinalis</i> L. (partes aéreas)	Extrato bruto de diclorometano	Com atividade	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ; <i>A. actinomycetemcomitans</i> ; <i>Prevotella nigrescen</i> ; <i>Fusobacterium nucleatum</i> e <i>Prevotella melaninogenica</i>
		Subfração do extrato de diclorometano	Com atividade	<i>P. gingivalis</i> ; <i>A. actinomycetemcomitans</i> ; <i>P. intermedia</i> ; <i>P. nigrescen</i> ; <i>F. nucleatum</i> e <i>P. melaninogenica</i>
			Sem atividade	<i>P. intermedia</i>
		Subfração do extrato de diclorometano solúvel em n-hexano da fração solúvel em n-hexano	Com atividade	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
			Sem atividade	<i>P. gingivalis</i> ; <i>Prevotella intermedia</i> ; <i>Prevotella nigrescen</i> ; <i>F. nucleatum</i> e <i>P. melaninogenica</i>
		Manool	Com atividade	<i>P. gingivalis</i> , <i>F. nucleatum</i> e <i>A. actinomycetemcomitans</i> .
			Sem atividade	<i>P. intermedia</i> ; <i>P. nigrescen</i> ; e <i>P. melaninogenica</i>



Tabela 1. Lista de algumas plantas com ou sem atividade bacteriana (continuação).

Referência bibliográfica	Plantas	Extratos (solvente)	Atividade antibacteriana	Bactérias
(Silva et al., 2020)	<i>C. sativa</i> Mill (Casca)	Etanol	Com atividade	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Bacillus cereus</i> .
			Sem atividade	<i>E. coli</i> e <i>S. enterica subsp. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
	Com atividade		<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Bacillus cereus</i> .	
	Sem atividade		<i>E. coli</i> , <i>S. enterica subsp. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> , <i>Enterococcus faecium</i> e <i>K. pneumoniae</i> .	
	Com atividade		<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>K. pneumoniae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Bacillus cereus</i> .	
	Sem atividade		<i>E. coli</i> , <i>S. enterica subsp. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> <i>Enterococcus faecium</i>	
	<i>C. sativa</i> Mill (Ouriço)			
	<i>C. sativa</i> Mill (folha)			



Tabela 1. Lista de algumas plantas com ou sem atividade bacteriana (continuação).

Referência bibliográfica	Plantas <i>Espécie</i> (parte)	Extratos (solvente)	Atividade antibacteriana	Bactérias
(Anzano et al., 2022)	<i>M. oleífera</i> (folhas)	N-hexano; Metanol; Óxido de deutério e	Sem atividade	<i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. enterica subsp. enterica</i> sorovar <i>Typhimurium</i> .
	<i>M. oleífera</i> (sementes)	Sulfonato de sódio dimetil-4-silapentano (DSS)	Com atividade	<i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i> ;
			Sem atividade	<i>P. aeruginosa</i> e <i>S. enterica subsp. enterica</i> sorovar <i>Typhimurium</i> .



### 1.3. Testes de avaliação da atividade antibacteriana

O teste de sensibilidade antimicrobiana é uma ferramenta crucial utilizada na descoberta de novas drogas, epidemiologia e previsão de resultados terapêuticos. Neste trabalho, destacamos o emprego de métodos de teste antimicrobiano para investigação *in vitro* de extratos como possíveis agentes antimicrobianos (Balouiri et al., 2016).

Nesse contexto, a busca por novos antibióticos é de suma importância, e os produtos naturais continuam sendo uma das principais fontes de novas moléculas terapêuticas. Plantas e outras fontes naturais oferecem uma ampla gama de compostos complexos e estruturalmente diversos, muitos dos quais têm potencial antimicrobiano (Amparo et al., 2018).

A busca por novos compostos antimicrobianos é impulsionada pela crescente resistência antimicrobiana, que compromete a eficácia dos antibióticos tradicionais (Hossain, 2024).

#### 1.3.1. Métodos de difusão

Os métodos de difusão são amplamente utilizados em laboratórios de microbiologia para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos, frações ou substâncias puras, bem como para investigar o antagonismo entre microrganismos. Esses métodos se baseiam na difusão de agentes antimicrobianos através de um meio sólido (geralmente agar) e medem a capacidade dessas substâncias de inibir o crescimento de microrganismos (Balouiri et al., 2016).

##### 1.3.1.1. Método de difusão em disco de agar

O teste de difusão em disco em agar, desenvolvido em 1940, é utilizado em laboratórios de microbiologia clínica para testar a suscetibilidade antimicrobiana. Este método envolve inocular placas de agar com um inóculo padronizado do microrganismo em teste e, em seguida, colocar discos de papel de filtro impregnados com o antimicrobiano na superfície do agar. Após incubação, o antimicrobiano difunde-se e inibe o crescimento do microrganismo, criando zonas de inibição que são medidas para determinar se as bactérias são suscetíveis, intermediárias ou resistentes ao composto testado (Balouiri et al., 2016).

A padronização permite testar certos patógenos bacterianos fastidiosos como estreptococos e espécies de *Haemophilus* sp. e *Neisseria* sp. usando meios específicos e condições de incubação apropriadas. Contudo, este método não diferencia entre efeitos



bactericidas e bacteriostáticos e não determina a CMI, embora uma CMI aproximada possa ser inferida para alguns casos (Balouiri et al., 2016).

O teste de difusão em disco é preferido por sua simplicidade, baixo custo, capacidade de testar muitos microrganismos e agentes, e pela facilidade de interpretação. Além disso, os resultados fornecem informações valiosas para a escolha de tratamentos antibióticos adequados, correlacionando bem os dados *in vitro* com a evolução clínica dos pacientes (Balouiri et al., 2016).

#### **1.3.1.2. Método de difusão em poço de agar**

O método de difusão em poço de agar é amplamente utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de plantas ou extratos microbianos. Semelhante ao método de difusão em disco, a superfície da placa de agar é inoculada com o microrganismo. Em seguida, um furo de 6 a 8 mm é perfurado no agar com uma broca estéril ou uma ponta. Um volume de 20–100  $\mu\text{L}$  do agente antimicrobiano ou extrato na concentração desejada é introduzido no poço. As placas são então incubadas sob condições apropriadas para o microrganismo em teste. O antimicrobiano se difunde no agar e inibe o crescimento do microrganismo ao redor do poço (Balouiri et al., 2016).

#### **1.3.1.3. Método de difusão em tampão de agar**

O método de difusão em tampão de agar é usado para identificar o antagonismo entre microrganismos, semelhante método de difusão em disco. Consiste em cultivar a estripe de interesse em agar, formando faixas estreitas na superfície da placa. Durante o crescimento, os microrganismos segregam moléculas que se difundem no agar. Após a incubação, um cilindro de agar é cortado com uma broca estéril e colocado na superfície de outra placa de agar previamente inoculada com o microrganismo teste. As substâncias difundem-se do tampão para o agar, e a atividade antimicrobiana é indicada pela formação de uma zona de inibição ao redor do tampão (Balouiri et al., 2016).

#### **1.3.2. Método de gradiente antimicrobiano (*Etest*)**

O método do gradiente antimicrobiano combina princípios de diluição e difusão para determinar a CMI de agentes antimicrobianos. O *Etest*<sup>®</sup> (*BioMérieux*) é uma versão comercial. Neste procedimento, uma tira impregnada com um gradiente de concentração do antimicrobiano



é colocada sobre uma superfície de agar inoculada com o microrganismo. A CMI é determinada na intersecção da tira com a elipse de inibição do crescimento (Hossain, 2024).

Este método é utilizado para determinar a CMI de antibióticos, antifúngicos e antibacterianos, sendo simples de implementar e utilizado rotineiramente (Hossain, 2024).

### **1.3.3. Método de listras cruzadas**

O método de listras cruzadas é usado para detetar rapidamente o antagonismo entre microrganismos. Uma faixa da estripe microbiana de interesse é semeada no centro de uma placa de agar. Após incubação, microrganismos testados são semeados em linhas perpendiculares à faixa central. Após nova incubação, as interações antimicrobianas são avaliadas pela observação das zonas de inibição ao longo das interseções (Hossain, 2024).

### **1.3.4. Métodos de diluição**

Os métodos de diluição são amplamente considerados os mais adequados para determinar os valores de CMI em testes de suscetibilidade antimicrobiana. Eles permitem estimar a concentração do agente antimicrobiano no meio de cultura, seja em agar ou meio caldo (macrodiluição ou microdiluição). Esses métodos são utilizados para medir quantitativamente a atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias e fungos. O valor de CMI é a concentração mais baixa do agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível do microrganismo testado e é expresso geralmente em  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou  $\text{mg}/\text{L}$ . Existem várias diretrizes reconhecidas para esses testes, como as do CLSI e do EUCAST, que fornecem procedimentos uniformes e práticos para a maioria dos laboratórios de microbiologia clínica. Embora esses padrões metodológicos não garantam a relevância clínica dos testes, eles permitem que os bioensaios sejam realizados de forma padronizada, o que é essencial para avaliar a relevância clínica dos resultados (Balouiri et al., 2016).

#### **1.3.4.1. Método de diluição em caldo**

A micro ou macrodiluição em caldo é um dos métodos mais básicos de teste de suscetibilidade antimicrobiana. Esse procedimento envolve a preparação de diluições duplas do agente antimicrobiano em meio de crescimento líquido, que são dispensadas em tubos ou poços de placa de microtitulação. As diluições costumam seguir uma sequência dobrada (por exemplo, 1, 2, 4, 8, 16 e 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Em seguida, cada tubo ou poço é inoculado com uma quantidade



padronizada do microrganismo a ser testado, previamente diluído em meio de cultura. Após a inoculação, os tubos ou a microplaca são bem misturados e incubados em condições apropriadas, geralmente sem agitação (Balouiri et al., 2016).

A CMI é a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo em tubos ou microplacas, como detetado a olho nu. Em comparação com o método de microdiluição, a macrodiluição apresenta desvantagens, como a tarefa tediosa e manual, o risco de erros na preparação de soluções antimicrobianas e a quantidade maior de reagentes e espaço necessários. A microdiluição oferece vantagens significativas, como reprodutibilidade e economia de reagentes e espaço, devido à miniaturização do teste. No entanto, é crucial controlar cuidadosamente a abordagem para obter resultados reprodutíveis intra e inter laboratoriais (Hossain, 2024).

Para determinar o ponto final da CMI, dispositivos de visualização e métodos colorimétricos, como o uso de corantes como sais de tetrazólio, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), XTT (2,3-bis{2-metoxi-4-nitro-5[(sulfenilamino)carbonil]-2H-hidróxido de tetrazólio}), e o corante azul Alamar (resazurina), são frequentemente utilizados. O tamanho do inóculo, o tipo de meio de crescimento, o tempo de incubação e o método de preparação do inóculo podem influenciar os valores de CMI. Portanto, o CLSI padronizou a diluição do caldo para testar bactérias aeróbias, leveduras e fungos filamentosos. O método de diluição em caldo do EUCAST é semelhante ao do CLSI, com algumas modificações nos parâmetros do teste, como preparação e tamanho do inóculo, e método de leitura MIC (Balouiri et al., 2016).

#### **1.3.4.2. Método de diluição em agar**

O método de diluição em agar envolve incorporar concentrações variadas de um agente antimicrobiano em meio agar fundido, geralmente utilizando diluições duplas em série. Em seguida, um inóculo microbiano definido é inoculado na superfície da placa de agar. A CMI é registada como a menor concentração do agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento microbiano sob condições de incubação apropriadas. Este método é útil para testes de suscetibilidade antibacteriana e antifúngica, especialmente quando múltiplos isolados estão sendo testados contra um único composto, ou quando o composto testado mascara o crescimento microbiano no meio líquido. É frequentemente preferido à diluição em caldo nessas situações. Atualmente, replicadores comerciais de inóculo podem transferir entre 32 e 60



inóculos bacterianos diferentes para cada placa de agar, facilitando o processo. Este método é recomendado para organismos exigentes, como anaeróbios e espécies de *Helicobacter*, e também tem sido utilizado para testar combinações de agentes antifúngicos contra *Candida* sp., *Aspergillus*, *Fusarium* e dermatófitos. Apresenta uma boa correlação com o *Etest*, principalmente para testes antibacterianos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e comparações com outros métodos como difusão em disco e microdiluição em caldo geralmente fornecem resultados excelentes (Balouiri et al., 2016).

### 1.3.5. Teste de eliminação de tempo (*time-kill*)

O teste *time-kill* é, de facto, uma técnica valiosa para avaliar o efeito bactericida ou fungicida de agentes antimicrobianos. Ele fornece informações cruciais sobre como a interação entre o agente antimicrobiano e o microrganismo varia ao longo do tempo ou com diferentes concentrações do agente (Hossain, 2024).

No caso das bactérias, o teste é realizado em meio de cultura líquida, geralmente utilizando três tubos contendo suspensões bacterianas em concentrações específicas. Dois desses tubos contêm o agente antimicrobiano em diferentes concentrações, enquanto o terceiro é usado como controle de crescimento. Os tubos são incubados por intervalos de tempo definidos, e então a viabilidade bacteriana é avaliada, geralmente por contagem de colónias em placas de agar (Hossain, 2024).

O resultado do teste *time-kill* é interpretado com base na percentagem de células mortas em comparação com o controle de crescimento ao longo do tempo. Um efeito bactericida significativo é tipicamente definido por uma redução de pelo menos 90% na viabilidade bacteriana em um determinado período, como 6 horas, o que equivale a uma letalidade de 99,9% em 24 horas (Hossain, 2024).

Além de determinar a eficácia de agentes antimicrobianos individuais, o teste *time-kill* também pode ser usado para avaliar interações entre diferentes medicamentos, como sinergismo ou antagonismo, quando usados em combinação (Balouiri et al., 2016).

Embora o teste *time-kill* tenha sido bem padronizado e descrito para bactérias, também tem sido utilizado com sucesso para avaliar a atividade de substâncias antifúngicas contra fungos. Isso destaca sua versatilidade e importância na pesquisa e no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Balouiri et al., 2016).



### 1.3.6. Ensaio de bioluminescência de Adenosina Trifosfato

O ensaio de bioluminescência de Adenosina Trifosfato (ATP) é realmente uma ferramenta poderosa com diversas aplicações. Sua capacidade de medir a quantidade de ATP, que está diretamente ligada à viabilidade celular, permite uma rápida e precisa avaliação do impacto de substâncias ou condições sobre microrganismos (Balouiri et al., 2016).

Uma das principais vantagens desse ensaio é a rapidez com que fornece resultados quantitativos, especialmente quando comparado a métodos convencionais, como as técnicas de diluição para testes antimicrobianos. A capacidade de fornecer resultados em questão de dias, em vez de semanas, é crucial, especialmente em situações onde uma resposta rápida é necessária, como na avaliação da eficácia de tratamentos antibacterianos ou antifúngicos (Balouiri et al., 2016).

Sua versatilidade também é evidente nas diversas aplicações mencionadas, que vão desde testes de citotoxicidade até triagem de drogas e avaliação de agentes antimicrobianos. Isso destaca a ampla gama de cenários em que essa técnica pode ser aplicada, fornecendo uma valiosa ferramenta para a pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos e terapias (Balouiri et al., 2016).

### 1.3.7. Método citofluorométrico de fluxo

A citometria de fluxo tem sido explorada há vários anos como uma ferramenta promissora para testes de suscetibilidade de microrganismos. A rápida detecção de células danificadas depende do uso de corantes apropriados, como o iodeto de propídio (PI), que é amplamente utilizado como corante de DNA (Hossain, 2024).

A eficácia do citómetro de fluxo como uma ferramenta para testes antibacterianos de óleos essenciais contra *Listeria monocytogenes* tem sido demonstrada em estudos que utilizam coloração combinada com PI para avaliar danos à membrana e diacetato de carboxifluoresceína (cFDA) para detetar atividade de esterase. Isso permite discriminar três subpopulações de células: mortas, viáveis e lesionadas. As células lesionadas são consideradas estressadas, exibindo danos aos componentes celulares e comprometimento subsequente do crescimento reprodutivo (Hossain, 2024).

A quantificação de células danificadas é particularmente relevante na microbiologia alimentar, onde a subpopulação de células lesionadas pode ser crítica em condições como abuso de temperatura durante o armazenamento de alimentos. A citometria de fluxo também permite



a deteção da resistência antimicrobiana e estima o impacto da molécula testada na viabilidade e no dano celular do microrganismo, fornecendo resultados reprodutíveis rapidamente em comparação com métodos tradicionais como o de microdiluição (Hossain, 2024).

No entanto, a utilização generalizada desta metodologia para testes de suscetibilidade antimicrobiana é atualmente limitada pela inacessibilidade do equipamento de citometria de fluxo em vários laboratórios. Isso pode dificultar sua adoção em escala mais ampla, apesar de suas vantagens em termos de rapidez e precisão na análise (Hossain, 2024).

#### **1.4. Problemática**

A indústria da castanha tem um impacto significativo na economia agrícola, principalmente em regiões onde a produção é abundante. No entanto, a sua cadeia de produção gera grandes volumes de resíduos, como casca e ouriço, que são frequentemente descartados de maneira inadequada ou subutilizados. Estes resíduos, no entanto, possuem compostos bioativos de grande interesse, como taninos e fenóis, que podem ser explorados em várias aplicações, incluindo a atividade antimicrobiana (Chiriacò et al., 2024).

A resistência bacteriana a antibióticos tem-se tornado um problema de saúde global urgente. Estripes bacterianas patogénicas, como *E. coli* (Porras et al., 2021), *S. aureus* (Taylor & Unakal, 2023) e *P. aeruginosa* (Walker & Moore, 2015), têm demonstrado crescente resistência aos antibióticos tradicionais, limitando as opções de tratamento para infeções comuns e complicadas. Isso impulsiona a necessidade de identificar novas fontes de compostos antimicrobianos.

Dada a abundância e disponibilidade de resíduos da castanha, surge a questão: será possível aproveitar esses resíduos para extrair compostos que possuam atividade antibacteriana? Além disso, o uso de técnicas de extração ambientalmente amigáveis, como a extração subcrítica, pode fornecer extratos ricos em compostos bioativos com menor impacto ambiental.

Esta dissertação procura, assim, investigar a atividade antibacteriana dos extratos de casca de castanha e ouriço, usando a extração subcrítica, e avaliar o seu potencial contra estripes bacterianas patogénicas. Isso poderá fornecer uma alternativa sustentável ao uso de antibióticos comerciais, além de promover o aproveitamento de resíduos industriais.



### 1.5. Objetivos

Esta dissertação tem como objetivo principal avaliar a atividade antibacteriana dos extratos da extração subcrítica de casca de castanha e de ouriço. Sendo assim, os objetivos específicos são:

- Investigar o potencial antibacteriano dos extratos de castanha e a sua aplicabilidade no combate a infeções bacterianas;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória dos extratos de casca de castanha e de ouriço em relação a diferentes estirpes bacterianas (por exemplo, *S. epidermidis*, *E. coli*, *S. aureus*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*), avaliar a eficácia dos extratos em diferentes concentrações;
- Comparar a atividade antibacteriana entre os extratos de casca de castanha e ouriço, identificando qual dos dois apresenta maior eficácia e em quais condições.

## 2. Métodos

Esta dissertação resulta de um trabalho experimental realizado nas instalações do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).

### 2.1. Matérias-primas e Espécies bacterianas

Os extratos de casca de castanha e ouriço foram obtidos por extração subcrítica, um processo que utiliza fluidos pressurizados a baixas temperaturas para preservar compostos bioativos. Após a extração, os extratos foram liofilizados para garantir estabilidade e concentração adequada. O meio de cultura utilizado foi Mueller-Hinton Broth (MH) (Sigma-Aldrich®), preparado tanto na forma líquida como sólida, esta última contendo 1,5% de agar para a formação de colónias.

As estirpes bacterianas utilizadas no estudo foram *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Todas as estirpes foram adquiridas de coleções microbiológicas certificadas e mantidas em condições apropriadas para sua viabilidade. Antes dos ensaios, as bactérias foram cultivadas em meio MH e incubadas a 36 °C por 24 h para garantir seu crescimento e adaptação ao meio de cultura.

### 2.2. Preparo e análise dos extratos

Os extratos de casca de castanha e ouriço foram pesados com precisão em uma balança analítica (Kern® ALJ 250-4-A) e dissolvidos no meio de cultura MH na concentração de 45 mg/mL. Para garantir a esterilidade, as soluções foram filtradas através de uma membrana esterilizante e armazenadas em tubos estéreis até sua utilização nos ensaios microbiológicos.

Para a preparação das suspensões bacterianas, uma colónia isolada de cada estirpe foi transferida para um tubo contendo meio MH líquido e incubada a 36 °C por 24 h. A suspensão resultante foi homogeneizada em vortex para assegurar uma distribuição uniforme das células. A densidade óptica (DO) foi medida em um espectrofotômetro (Shimadzu® UV-160) a 600 nm, ajustando-se a suspensão para uma DO de 0,08 com o meio MH como controle.

### 2.3. Ensaio microbiológicos

Os testes foram conduzidos em microplacas estéreis, onde os extratos foram distribuídos conforme segue:

Colunas 1, 2 e 3: 200  $\mu$ L de extrato;

Colunas 4, 5 e 6: 150  $\mu$ L de extrato + 50  $\mu$ L de MH;

Colunas 7, 8 e 9: 100  $\mu$ L de extrato + 100  $\mu$ L de MH;

Colunas 10, 11 e 12: 50  $\mu$ L de extrato + 150  $\mu$ L de MH.

Na linha E, adicionaram-se os controlos dos extratos (200  $\mu$ L) e na linha H, o controle do meio MH (200  $\mu$ L). Por fim, adicionaram-se 50  $\mu$ L da suspensão bacteriana a todos os poços, exceto nos controlos. As microplacas foram incubadas a 36 °C por 24 h.

#### **2.4. Avaliação do Crescimento Bacteriano**

Após o período de incubação, foram realizadas diluições seriadas para quantificação das unidades formadoras de colónias (UFC). As diluições foram preparadas conforme descrito:

Diluição  $10^{-2}$ : 10  $\mu$ L da suspensão foram transferidos para 990  $\mu$ L de água esterilizada e homogeneizados em vortex a 1800 rpm por 2 minutos;

Diluição  $10^{-4}$ : 10  $\mu$ L da diluição  $10^{-2}$  foram transferidos para 990  $\mu$ L de água esterilizada e homogeneizados em vortex a 1800 rpm por 2 minutos;

Diluição  $10^{-6}$ : 10  $\mu$ L da diluição  $10^{-4}$  foram transferidos para 990  $\mu$ L de água esterilizada e homogeneizados em vortex a 1800 rpm por 2 minutos.

Cada diluição (40  $\mu$ L) foi semeada em placas de Petri contendo MH Agar, espalhando-se uniformemente sobre a superfície. As placas foram incubadas a 36 °C por 24 h. O crescimento bacteriano foi avaliado por contagem de UFC nas placas, conforme ilustrado nas Figuras 6, 7 e 8 do Anexo III.



## 2.1. Matérias-primas e Espécies bacterianas

Os extratos de casca de castanha e ouriço foram obtidos por extracção subcrítica e posteriormente liofilizados. Foi usado meio de cultura bacteriana *Mueller-Hinton Broth*, MH (*Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>) preparado na forma líquida e sólida (com agar a 1,5%).

As estirpes bacterianas usadas foram: *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2.2. Análise dos extratos

Os extratos de castanha foram pesados numa balança analítica (*Kern*<sup>®</sup> *ALJ 250-4-A*) e dissolvidos em meio de cultura líquido MH, numa concentração de 45 mg/mL. Após a dissolução, a solução foi esterilizada passando-a através de uma membrana de filtro esterilizante para um tubo também esterilizado.

Com o auxílio de uma ansa, transferiu-se uma colónia de uma estirpe bacteriana selecionada para o estudo para um tubo de ensaio contendo meio de cultura líquido MH, colocou-se na estufa a 36 °C durante 24 h. Homogeneizou-se a suspensão de bactérias usando um *vortex* para assegurar uma distribuição uniforme das células bacterianas. Mediu-se a densidade ótica (DO) da suspensão bacteriana e diluiu-se com o meio de cultura MH até obter uma DO de 0,08 nm medida num espectrofotómetro (*Shimadzu*<sup>®</sup> *UV- 160*) a 600 nanómetros, utilizando como branco o meio de cultura.

Numa microplaca estéril (Figura 2), adicionaram-se 200 µL de extrato (de casca ou de ouriço de castanha) nas colunas 1, 2 e 3, 150 µL nas colunas 4, 5 e 6, 100 µL nas colunas 7, 8 e 9 e 50 µL nas colunas 10, 11 e 12. Adicionaram-se as seguintes quantidades de meio MH: 50 µL de (nas colunas 4, 5 e 6), 100 µL de MH (nas colunas 7, 8 e 9) e 150 µL de MH (nas colunas 10, 11 e 12). Na linha E colocaram-se os controlos dos extratos (200 µL) e na linha H colocou-se o controlo do meio MH (200 µL). No fim, adicionou-se 50 µL de suspensão bacteriana a todos os poços da



placa, exceto os controlos conforme observado no Anexo I, Figura 3 e 4. Deixou-se a microplaca a incubar a 36 °C durante 24 h.

Para avaliar o crescimento, após o período de incubação, realizaram-se várias diluições dos poços da microplaca. Para a diluição  $10^{-2}$ , num frasco identificado contendo 990  $\mu\text{L}$  de água esterilizada, adicionaram-se 10  $\mu\text{L}$  de cada poço da microplaca e agitou-se em vortex a 1800 rpm durante 2 minutos. Para a diluição  $10^{-4}$ , num frasco identificado contendo 990  $\mu\text{L}$  de água esterilizada adicionaram-se 10  $\mu\text{L}$  da suspensão  $10^{-2}$  e agitou-se em vortex a 1800 rpm durante 2 minutos. Para a diluição  $10^{-6}$ , num frasco identificado contendo 990  $\mu\text{L}$  de água esterilizada, adicionaram-se 10  $\mu\text{L}$  da suspensão  $10^{-4}$  e agitou-se em vortex a 1800 rpm durante 2 minutos. Aplicaram-se 40  $\mu\text{L}$  de cada diluição em placas de Petri com meio de cultura MH Agar, previamente identificadas, e espalhou-se em toda a superfície do meio de cultura, de maneira uniforme. As placas de Petri foram incubadas a 36°C por 24 h como ilustrado na Figura 5 do Anexo II. Após o período de incubação, o número de unidades formadoras de colónias (UFC) foi determinado conforme evidenciado nas Figuras 6, 7 e 8 do Anexo III.

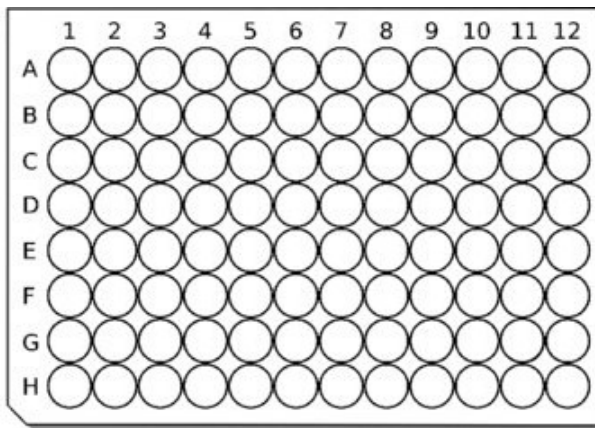


Figura 2: - Representação das microplacas utilizadas.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Avaliação da *Staphylococcus epidermidis*

O *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria Gram-positiva que faz parte da microbiota normal da pele e das mucosas humanas. A presença de *S. epidermidis* pode estimular uma resposta imune saudável, ajudando o corpo a reagir a invasões de patógenos. Devido ao aumento da resistência antimicrobiana, o *S. epidermidis* tem ganho destaque em estudos de avaliação de atividade antibacteriana, especialmente na busca por novas fontes de compostos bioativos, como produtos naturais. *S. epidermidis* é um excelente organismo modelo para testar novos compostos antibacteriano (Severn & Horswill, 2023).

Demonstrar a eficácia de extratos de castanha ou compostos isolados contra essa bactéria pode indicar um potencial uso na medicina ou na indústria farmacêutica. Testar os efeitos dos extratos da castanha contra estripes de *S. epidermidis* resistentes a antibióticos permite avaliar a capacidade dos compostos naturais em superar a resistência bacteriana, um dos maiores desafios da saúde pública atualmente. A indústria da castanha pode se beneficiar da caracterização de produtos e subprodutos com propriedades antimicrobianas (Santos et al., 2022). Isso pode agregar valor à cadeia produtiva, criando produtos ou ingredientes para o setor alimentício, cosmético ou de saúde. Além disso, compostos com ação contra *S. epidermidis* podem ser utilizados em formulações de desinfetantes, cosméticos (Fournière et al., 2020) ou tratamentos tópicos que visam a prevenção de infecções cutâneas (Zhou et al., 2020) (Nakatsuji et al., 2018).

É importante observar a relação entre a concentração dos extratos (em mg/mL) e a formação de unidades formadoras de colónias (em UFC/mL) como mostra na tabela 2.

Quando o extrato de casca de castanha foi testado em diferentes concentrações, observou-se uma tendência de aumento no crescimento bacteriano à medida que a concentração do extrato diminuía. A 36 mg/mL, não houve formação de colónias, indicando uma inibição completa do crescimento bacteriano nessa concentração. No entanto, quando a concentração foi reduzida para 27 mg/mL, surgiram 45 UFC, resultando em  $4,5 \times 10^5$  UFC/mL, mostrando que o crescimento bacteriano ainda não foi completamente inibido, mas já foi significativamente reduzido. Ao reduzir ainda mais a concentração do extrato para 18 mg/mL, o número de colónias aumentou para 113, correspondendo a uma UFC/mL de  $1,13 \times 10^6$ , sugerindo que a inibição foi ainda menor. Na concentração mais baixa testada, 6 mg/mL, o crescimento

bacteriano foi bastante elevado, com 200 colónias e uma UFC/mL de  $2,0 \times 10^6$ , indicando que o extrato tem pouca ou nenhuma ação inibitória nessa concentração.

Tabela 2. Número de UFC obtidas de *S. epidermidis* em concentrações crescentes de extrato de casca de castanha e de extrato de ouriço de castanha

Amostra	Concentração (mg/mL)	Número de colónias ( $10^{-4}$ )	UFC/mL
<b>Extrato de casca de castanha</b>			
A1 a A3	36	0	0
A4 a A6	27	45	$4,50 \times 10^5$
A7 a A9	18	113	$1,13 \times 10^6$
A10 a A12	6	200	$2,00 \times 10^6$
<b>Extrato de ouriço</b>			
B1 a B3	36	0	0
B4 a B6	27	0	0
B7 a B9	18	0	0
B10 a B12	6	1	$1,00 \times 10^5$

Já no caso do extrato de ouriço de castanha, a tendência de inibição foi um pouco diferente. Na concentração de 6 mg/mL, foi observada a formação de apenas 1 UFC, o que resultou em uma UFC/mL de  $1,0 \times 10^5$ , um valor extremamente baixo, sugerindo uma quase inibição completa do crescimento bacteriano nessa concentração. Isso indica que o extrato de ouriço de castanha é eficaz mesmo em concentrações relativamente baixas. Os dados de concentrações mais altas do extrato de ouriço (36 mg/mL, 27 mg/mL e 18 mg/mL) foi zero, é razoável inferir que essas concentrações seriam igualmente ou mais eficazes na inibição do crescimento bacteriano, com base no comportamento observado a 6 mg/mL.

A análise dos resultados demonstra que, para o extrato de casca de castanha, a concentração de 36 mg/mL é a CMI, pois é a menor concentração em que houve inibição completa do crescimento de *S. epidermidis*. Para o extrato de ouriço de castanha, a CMI é estimada em 18 mg/mL, já que essa concentração foi inibiu completamente o crescimento bacteriana.

De qualquer modo fica evidenciada a atividade bacteriana dos extratos relativamente à *S. epidermidis*.



Neste experimento, a CMI do extrato de casca de castanha para *S. epidermidis* foi de 36 mg/mL, significativamente maior que os valores de 5-10 mg/mL encontrados por Silva et al. (2020). Uma possível explicação para essa diferença é o método de extração utilizado. Silva et al. utilizaram uma combinação de solventes orgânicos e água destilada, o que pode ter concentrado uma maior quantidade de compostos bioativos, resultando em uma maior eficácia antimicrobiana (Silva et al., 2020).

### 3.2. Avaliação da *Staphylococcus aureus*

A avaliação da atividade antibacteriana de extratos de resíduos da indústria da castanha, utilizando *S. aureus* como organismo modelo, reveste-se de importância significativa. *S. aureus* é um patógeno humano relevante, responsável por uma variedade de infecções, desde complicações cutâneas até infecções sistêmicas graves. Além disso, a resistência a antibióticos, notadamente em estirpes resistentes à antibióticos, sublinha a necessidade de explorar novas fontes de antimicrobianos, como os compostos extraídos de plantas (Taylor & Unakal, 2023).

Essa bactéria é um patógeno comum em infecções hospitalares e comunitárias, o que torna urgente a busca por novos compostos antimicrobianos (Álvarez et al., 2019). A indústria da castanha, ao gerar resíduos como casca e ouriço, oferece uma rica fonte de composto bioativo, como taninos que possuem propriedades antimicrobianas (Caprarulo et al., 2021).

Nos experimentos realizados com *S. aureus*, foi possível correlacionar o UFC com a concentração dos extratos de casca de castanha e de ouriço como se pode ver na tabela 3. Para o extrato de casca de castanha, nas amostras com concentração de 6 mg/mL, foram observadas contagens de  $1,80 \times 10^5$  UFC/mL. Esse resultado indica que, mesmo em baixas concentrações, ainda houve crescimento bacteriano, sugerindo que a CMI será próxima de 18 mg/mL.

Tabela 3. Número de UFC obtidas de *S. aureus* em concentrações crescentes de extrato de casca de castanha e de extrato de ouriço de castanha

Amostra	Concentração (mg/mL)	Número de colónias ( $10^{-4}$ )	UFC/mL
<b>Extrato de casca de castanha</b>			
A1 a A3	36	0	0
A4 a A6	27	0	0
A7 a A9	18	0	0
A10 a A12	6	18	$1,80 \times 10^5$
<b>Extrato de ouriço</b>			
B1 a B3	36	0	0
B4 a B6	27	0	0
B7 a B9	18	0	0
B10 a B12	6	294	$2,94 \times 10^6$

O extrato de ouriço mostrou uma inibição até à concentração de 18 mg/mL, apresentando  $2,94 \times 10^6$  UFC a 6 mg/mL. Estes resultados sugerem uma CMI para o extrato de ouriço está próxima de 18 mg/mL.

Assim, pode-se concluir que, para o extrato de castanha, concentrações superiores a 6 mg/mL e menores que 18 mg/mL devem ser testadas para encontrar a CMI exata, para inibir o crescimento de *S. aureus*.

Em contraste, o artigo de Kolayli et al. (2016) reporta que diferentes graus de mel de castanha possuem propriedades antimicrobianas, com CMIs variando de 8 a 12 mg/mL para *S. aureus*. Os compostos fenólicos e flavonoides presentes na casca de castanha foram identificados como os principais responsáveis por essa atividade antimicrobiana, o que destaca a relevância dos extratos obtidos a partir desse material (Kolayli et al., 2016).

A extração de compostos bioativos da casca de castanha geralmente envolve o uso de solventes como etanol, metanol ou água, e pode ser realizada por meio de métodos como maceração, ultrassom ou refluxo. As condições de extração, incluindo temperatura, tempo e proporção de material sólido para líquido, têm um impacto significativo na eficiência da extração e, por consequência, na atividade antimicrobiana dos extratos (Kolayli et al., 2016).

### 3.3. Avaliação da *Escherichia coli*

A utilização de *E. coli* na avaliação da atividade antibacteriana de extratos de resíduos da indústria da castanha tem grande importância devido ao papel dessa bactéria como patógeno e modelo em pesquisas microbiológicas. *E. coli* é amplamente empregue em estudos por ser uma bactéria Gram-negativa de fácil cultivo e rápida replicação, o que facilita a obtenção de resultados consistentes e em tempo hábil. Além disso, esta bactéria, apesar de fazer parte da microbiota intestinal humana, pode atuar como patógeno oportunista em infecções, especialmente no trato urinário e em ambientes hospitalares, sendo relevante para investigações que visam o desenvolvimento de novos antimicrobianos (Mueller & Tainter, 2023).

Outro ponto importante é o crescente problema da resistência antimicrobiana, no qual certas estirpes de *E. coli* têm mostrado capacidade de resistir a múltiplos antibióticos. Isso torna crucial a busca por novas substâncias com potencial antimicrobiano, como os extratos de origem natural, que podem oferecer alternativas promissoras para o combate a infecções bacterianas resistentes (Porras et al., 2021).

A tabela 4 mostra a correlação entre a concentração dos extratos de casca de castanha e de ouriço com o crescimento bacteriano de *E. coli* feita a partir da observação do número de UFC em diferentes concentrações. Para isso, utilizou-se diluições seriadas dos extratos em concentrações previamente definidas (36 mg/mL, 27 mg/mL, 18 mg/mL e 6 mg/mL) e se mediu o número de colônias de *E. coli* formadas após um período de incubação.

Tabela 4. Número de UFC obtidas de *E. coli* em concentrações crescentes de extrato de casca de castanha e de extrato de ouriço de castanha.

Amostra	Concentração (mg/mL)	Número de colônias ( $10^{-6}$ )	UFC/mL
<b>Extrato de casca de castanha</b>			
A1 a A3	36	0	0
A4 a A6	27	0	0
A7 a A9	18	0	0
A10 a A12	6	9	$9,00 \times 10^6$
<b>Extrato de ouriço</b>			
B1 a B3	36	0	0
B4 a B6	27	0	0
B7 a B9	18	0	0
B10 a B12	6	31	$31,0 \times 10^6$



Ao analisar a amostra com 6 mg/mL de extrato de casca de castanha, foi observado o crescimento de 9 colónias, correspondente a  $9,00 \times 10^6$  UFC/mL, enquanto na amostra com a mesma concentração de extrato de ouriço, cresceram 31 colónias, equivalente a  $31 \times 10^6$  UFC/mL. Esses dados indicam que o extrato de casca de que ambos os extratos têm o idêntico valor de CMI (18 mg/mL) para a *E. coli*.

No estudo de Kolayli et al. (2016), por exemplo, embora focado em mel de castanha, sugere-se que compostos presentes nos extratos de castanha têm potencial atividade antibacteriana (Kolayli et al., 2016). Outros estudos, como os de Barreira et al. (2020), reportam CMIs para extratos de *C. sativa* Mill variando de 8 a 32 mg/mL contra *E. coli*, dependendo do método de extração e dos solventes utilizados (Barreira et al., 2020).

A amostra de extrato de ouriço apresentou um maior crescimento bacteriano, com 31 colónias ( $31,0 \times 10^6$  UFC/mL) na mesma concentração, indicando uma atividade antimicrobiana inferior em comparação ao extrato de casca de castanha.

Assim, podemos inferir que, enquanto os extratos de castanha demonstram alguma eficácia na inibição de *E. coli*, os valores de CIM indicados na literatura sugerem que uma concentração de pelo menos 8 mg/mL pode ser necessária para se observar uma inibição significativa. Portanto, para otimizar a eficácia antimicrobiana do extrato de casca de castanha, seria interessante testar concentrações superiores entre 6 e 18 mg/mL.

Um artigo indicou que, para *E. coli*, a CMI dos extratos de *C. sativa* Mill (casca, ouriço e folha) variou de 5 a 10 mg/mL, dependendo da parte do subproduto e do método de extração utilizado (Silva et al., 2020).

Essa análise ressalta a importância da escolha do método de extração, pois diferentes solventes e técnicas podem resultar em concentrações variadas de compostos bioativos que influenciam diretamente a atividade antimicrobiana observada.

### **3.4. Avaliação da *Serratia marcescens***

*Serratia marcescens* (*S. marcescens*) é uma bactéria de grande importância devido à sua capacidade de causar infecções hospitalares (infecções nosocomiais) e por sua resistência a diversos antimicrobianos. Essa espécie é frequentemente encontrada em ambientes hospitalares, como respiradores, cateteres e outras superfícies húmidas, sendo um agente comum em infecções associadas a dispositivos médicos (Zaric et al., 2023). As infecções mais

comuns causadas por *S. marcescens* incluem infeções do trato urinário, pneumonia, bacteremia e infeções de feridas.

Uma das grandes dificuldades no tratamento dessas infeções é a habilidade de *S. marcescens* em formar biofilmes em superfícies médicas, o que oferece uma proteção adicional contra antibióticos e à resposta imune do hospedeiro (Yin et al., 2021). Além disso, a bactéria é conhecida por sua pigmentação característica, comumente vermelha, o que facilita sua identificação laboratorial e seu uso como modelo em estudos de inibição bacteriana. Seu comportamento oportunista e sua presença em infeções de pacientes imunocomprometidos a tornam altamente relevante no controle de infeções hospitalares (Sandner-Miranda et al., 2018).

O uso de *S. marcescens* em testes de extratos de resíduos da indústria da castanha é particularmente relevante devido à sua resistência intrínseca, permitindo avaliar a capacidade dos extratos de superar as defesas bacterianas. Além disso, é uma bactéria de fácil cultivo e manipulação laboratorial, o que facilita a execução de ensaios em microplacas e contagens de UFC (Weber et al., 2020).

Nos experimentos realizados com *S. marcescens*, foi possível correlacionar a concentração dos extratos de casca de castanha e ouriço com o número e UFC (Tabela 5). Para o extrato de casca de castanha, utilizou-se concentrações de 6 mg/mL a 36 mg/mL. A CMI para o extrato de casca de castanha para a *S. marcescens* foi cerca de 27 mg/mL.



Tabela 5. Número de UFC obtidas de *S. marcescens* em concentrações crescentes de extrato de casca de castanha e de extrato de ouriço de castanha

Amostra	Concentração (mg/mL)	Diluição	Número de colónias	UFC/mL
<b>Extrato de casca de castanha</b>				
A1 a A3	36	10 <sup>-2</sup>	0	0
A4 a A6	27	10 <sup>-2</sup>	0	0
A7 a A9	18	10 <sup>-2</sup>	19	1,90 × 10 <sup>3</sup>
A10 a A12	6	10 <sup>-2</sup>	1	1,00 × 10 <sup>2</sup>
<b>Extrato de ouriço</b>				
B1 a B3	36	10 <sup>-2</sup>	0	0
		10 <sup>-4</sup>	0	0
		10 <sup>-6</sup>	0	0
B4 a B6	27	10 <sup>-2</sup>	0	0
		10 <sup>-4</sup>	0	0
		10 <sup>-6</sup>	104	1,04 × 10 <sup>8</sup>
B7 a B9	18	10 <sup>-2</sup>	0	0
		10 <sup>-4</sup>	0	0
		10 <sup>-6</sup>	6	6,00 × 10 <sup>6</sup>
B10 a B12	6	10 <sup>-2</sup>	0	0
		10 <sup>-4</sup>	1	1,00 × 10 <sup>4</sup>
		10 <sup>-6</sup>	2	2,00 × 10 <sup>6</sup>
H10 Controlo de MH	0	10 <sup>-2</sup>	0	0

Quanto ao extrato de ouriço, em todas as diluições 10<sup>-2</sup> não se verificou qualquer crescimento. Observaram-se UFC nas diluições 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup> o que provavelmente significa contaminação devido a mais passos de processamento da amostra

Esses dados sugerem que ambos os extratos, tanto de casca de castanha quanto de ouriço, possuem efeitos antimicrobianos contra *S. marcescens*, com uma redução significativa no número de colónias conforme a concentração dos extratos diminui, possibilitando o cálculo da CMI, em que para o extrato de casca de castanha próximo de 27 mg/mL. Para o extrato de ouriço, a concentração de 6 mg/mL também resultou em 1,00 UFC na diluição 10<sup>-4</sup> e zero colónias nas outras diluições subsequentes, sugerindo erro experimental. Portanto, a CMI para *S. marcescens* com o extrato de ouriço está abaixo de 6 mg/mL, sendo necessário testar com concentrações mais baixas.



A pesquisa realizada por Keskin et al. (2023) sobre a síntese de nanopartículas de prata mediadas por mel de castanha destaca a atividade antibacteriana de compostos derivados de *C. sativa* Mill. As concentrações testadas de nanopartículas de prata variaram de 50 a 150 µg/mL, enquanto a CMI mais baixa registada foi de 7 µg/mL, demonstrando a eficácia dessas nanopartículas em inibir a atividade bacteriana. Métodos de extração por solvente e infusão, são frequentemente utilizados para obter compostos bioativos de plantas, sendo fundamentais para determinar as propriedades antimicrobianas dos extratos.

Portanto, a evidência obtida nestes experimentos, junto com a literatura existente, sugere que os extratos de *C. sativa* Mill possuem propriedades antimicrobianas promissoras, especialmente contra *Serratia marcescens* (Keskin et al., 2023).

### 3.5. Avaliação da *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia, em forma de bastonete, amplamente encontrada no meio ambiente, incluindo solos, água e superfícies hospitalares. Ela se destaca por sua capacidade de sobreviver em uma grande variedade de condições adversas e é conhecida por causar infecções em humanos, especialmente em pessoas com o sistema imunológico comprometido ou com doenças crônicas (Reynolds & Kollef, 2021).

Uma das características mais notáveis de *P. aeruginosa* é sua resistência a uma ampla gama de antibióticos. Ela possui várias estratégias de defesa, incluindo bombas de efluxo que expulsam antibióticos das células, e a capacidade de formar biofilmes – estruturas que permitem à bactéria aderir a superfícies e se proteger contra agentes antimicrobianos. Essa resistência a antibióticos faz da *P. aeruginosa* uma das bactérias mais difíceis de tratar, especialmente em ambientes hospitalares, onde ela é uma das principais causas de infecções nosocomiais (Menezes et al., 2024).

A escolha da *P. aeruginosa* para estudos de atividade antibacteriana de extratos naturais, como os provenientes da indústria da castanha, é estratégica por vários motivos. Primeiro, a bactéria está frequentemente associada a infecções crônicas em pacientes com condições subjacentes, como fibrose cística e queimaduras, nas quais os antibióticos convencionais têm eficácia limitada (Féba & Wolff, 2022). Além disso, devido à formação de biofilmes, a *P. aeruginosa* pode sobreviver em superfícies hospitalares e dispositivos médicos, aumentando o



risco de infecções persistentes e resistentes (Walker & Moore, 2015). Portanto, qualquer substância que demonstre atividade contra essa bactéria pode ter grande impacto terapêutico.

A importância de se realizar tais experimentos com *P. aeruginosa* também reside no fato de que essa bactéria serve como modelo para testar compostos capazes de inibir bactérias Gram-negativas resistentes, muitas das quais compartilham características de resistência semelhantes. Isso significa que um extrato eficaz contra *P. aeruginosa* pode ser promissor contra outros patógenos multirresistentes (Tacconelli et al., 2018). Assim, o desenvolvimento de alternativas naturais, como os extratos da indústria da castanha, pode fornecer soluções inovadoras para o combate à resistência antimicrobiana, um dos maiores desafios de saúde pública mundial atualmente.

Na tabela 6 mostra as amostras de extrato de casca de castanha, com concentrações de 36 mg/mL, 27 mg/mL, 18 mg/mL e 6 mg/mL, e as amostras de extrato de ouriço, também nas mesmas concentrações, foram testadas.

Tabela 6. Número de UFC obtidas de *P. aeruginosa* em concentrações crescentes de extrato de casca de castanha e de extrato de ouriço de castanha

Amostra	Concentração (mg/mL)	Diluição	Número de colónias	UFC/mL
<b>Extrato de casca de castanha</b>				
A1 a A3	36	(10 <sup>-2</sup> ), (10 <sup>-4</sup> ) e (10 <sup>-6</sup> )	0	0
A4 a A6	27	(10 <sup>-2</sup> ), (10 <sup>-4</sup> ) e (10 <sup>-6</sup> )	0	0
A7 a A9	18	(10 <sup>-2</sup> ), (10 <sup>-4</sup> ) e (10 <sup>-6</sup> )	0	0
A10 a A12	6	(10 <sup>-2</sup> ), (10 <sup>-4</sup> ) e (10 <sup>-6</sup> )	0	0
<b>Extrato de ouriço</b>				
B1 a B3	36	(10 <sup>-2</sup> ), (10 <sup>-4</sup> ) e (10 <sup>-6</sup> )	0	0
B4 a B6	27	(10 <sup>-2</sup> ), (10 <sup>-4</sup> ) e (10 <sup>-6</sup> )	0	0
B7 a B9	18	(10 <sup>-2</sup> ), (10 <sup>-4</sup> ) e (10 <sup>-6</sup> )	0	0
B10 a B12	6	(10 <sup>-2</sup> ), (10 <sup>-4</sup> ) e (10 <sup>-6</sup> )	0	0
E10 a E12	6	10 <sup>-4</sup>	Incontável (E11) e incontável (E12)	Incontável
		10 <sup>-6</sup>	11 (E11), 22 (E12)	1,10×10 <sup>7</sup> e 2,20×10 <sup>7</sup>



Nos poços E10 a E12 estão apenas caldo de MH com a mesma quantidade de bactérias colocada em todos os poços. No que diz respeito às contagens de UFC, para todas diluições com extratos de castanha não se verificou qualquer crescimento o que sugere uma CMI para ambos os extratos menor que 6 mg/mL.

Neste estudo, foi observado que para *P. aeruginosa*, a atividade antimicrobiana do extrato de casca de castanha é bastante promissora.

Na literatura, estudo de Barreira et al. (2020) também avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de castanha contra *P. aeruginosa* relataram CMIs variando entre 12 mg/mL e 25 mg/mL, dependendo do método de extração e da parte da planta utilizada. Esses resultados sugerem que a eficiência antimicrobiana dos extratos pode ser similar ou até superior, dependendo das condições de extração (Barreira et al., 2020).

A comparação das CMIs indica que os extratos de casca de castanha possuem potencial significativo contra *P. aeruginosa*, e a escolha do método de extração é crucial para maximizar a atividade antimicrobiana. Para aumentar a eficácia dos extratos, recomenda-se testar diferentes condições de extração e avaliar suas CMIs em comparação com a literatura para otimizar a aplicação desses compostos bioativos em terapias antimicrobianas.



#### 4. Conclusão

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de extratos obtidos com extração subcrítica a partir resíduos da indústria da castanha, especificamente da casca e ouriço, contra diferentes estirpes bacterianas. Ao longo dos experimentos, foi possível observar que os extratos testados apresentaram potencial inibitório significativo contra as bactérias Gram negativo (*E. coli*, *S. marcescens*, e *P. aeruginosa*), e Gram positivo (*S. epidermidis* e *S. aureus*) com variações nos resultados dependendo da concentração e do tipo de extrato utilizado. Verificou-se que o extrato de casca de castanha apresentou um CMI de 36 mg/mL, para *S. epidermidis*, 18 mg/mL para *S. aureus* e *E. coli*, 27 mg/mL para a *S. marcescens* e menor que 6 mg/mL para a *P. aeruginosa*. Já o extrato de ouriço de castanha demonstrou uma CMI de 18 mg/mL para *S. epidermidis*, *S. aureus* e *E. coli*, 36 mg/mL para a *S. marcescens*, e menor que 6 mg/mL para a *P. aeruginosa*.

Além disso, a correlação entre a concentração dos extratos e o crescimento bacteriano foi clara, confirmando que o aumento da concentração dos extratos levou à redução significativa do UFC. Esse achado reforça a hipótese de que os subprodutos da castanha podem ser uma fonte promissora de compostos com propriedades antibacterianas.

Portanto, este estudo contribui para a valorização de resíduos da indústria da castanha como uma alternativa sustentável e eficaz na produção de agentes antimicrobianos. No entanto, futuros estudos são necessários para isolar os compostos bioativos específicos responsáveis pela atividade antimicrobiana observada e para avaliar a toxicidade e segurança desses extratos em aplicações industriais, como cosméticos ou produtos farmacêuticos.

## Referências Bibliográficas

- Álvarez, A., Fernández, L., Gutiérrez, D., Iglesias, B., Ana Rodríguez, & Pilar García. (2019).  
Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitals: Latest Trends and  
Treatments Based on Bacteriophages. *Journal of Clinical Microbiology*, *57*(12).  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01006-19>
- Amparo, T. R., Braga, V. C. C., Seibert, J. B., Souza, G. H. B. de, & Teixeira, L. F. M. (2018).  
MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
PLANTAS MEDICINAIS: A NECESSIDADE DA PADRONIZAÇÃO. *Infarma - Ciências  
Farmacêuticas*, *30*(1), Artigo 1. [https://doi.org/10.14450/2318-  
9312.v30.e1.a2018.pp50-59](https://doi.org/10.14450/2318-9312.v30.e1.a2018.pp50-59)
- Anzano, A., de Falco, B., Ammar, M., Ricciardelli, A., Grauso, L., Sabbah, M., Capparelli, R., &  
Lanzotti, V. (2022). Chemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Moringa oleifera*  
Lam. Leaves and Seeds. *Molecules*, *27*(24), 8920.  
<https://doi.org/10.3390/molecules27248920>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial  
activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71–79.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barreira, J. C. M., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2020). Bioactive Compounds of  
Chestnut (*Castanea sativa* Mill.). Em H. N. Murthy & V. A. Bapat (Eds.), *Bioactive  
Compounds in Underutilized Fruits and Nuts* (pp. 303–313). Springer International  
Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30182-8\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30182-8_18)

- Caprarulo, C. V., C. G., & L. R. (2021). Review: Chestnut and quebracho tannins in pig nutrition: the effects on performance and intestinal health. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 15(1). <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100064>
- Carvalho, A. F., Silva, D. M., Silva, T. R. C., Scarcelli, E., & Manhani, M. R. (2014). Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16, 521–526. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_159](https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_159)
- Chiriaco, M. V., Samad, N., Magnani, F., Acadêmico, P. CientíficosScilitPreprints. orgGoogle, Vianello, G., Vittori-Antisari, L., & Riccardo Valentin. (2024, setembro). *Ecofisiologia da castanha mediterrânea (Castanea sativa Mill.) Florestas: Efeitos da poda estudados por meio de um sistema avançado de IoT*. <https://www.mdpi.com/1999-4907/15/9/1579>
- Féba, L. S., & Wolff, J. L. C. (2022, novembro 16). ESTRATÉGIA PARA PROMOVER A RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA ENTRE FAGOS DE *Pseudomonas aeruginosa*. XVIII - JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - JIC - 2022. XVIII - JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - JIC - 2022. <http://eventoscopq.mackenzie.br/index.php/jornada/xviii/paper/view/2853>
- Fournière, M., Latire, T., Souak, D., Marc G. J. Feuilloley, & Gilles Bedoux. (2020). Staphylococcus epidermidis and Cutibacterium acnes: Two Major Sentinels of Skin Microbiota and the Influence of Cosmetics. *Microorganisms*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111752>
- Ginovyan, M., Petrosyan, M., & Trchounian, A. (2017). Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1573-y>

- Haque, S. D., Saha, S. K., Salma, U., Nishi, M. K., & Rahaman, M. S. (2019). Antibacterial Effect of Aloe vera (*Aloe barbadensis*) leaf gel against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Mymensingh Medical Journal: MMJ*, *28*(3), 490–496.
- Hossain, T. J. (2024). Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal of Microbiology & Immunology*, *14*(2), 97–115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>
- Keskin, M., Kaya, G., Bayram, S., Kurek-Górecka, A., & Olczyk, P. (2023). Green Synthesis, Characterization, Antioxidant, Antibacterial and Enzyme Inhibition Effects of Chestnut (*Castanea sativa*) Honey-Mediated Silver Nanoparticles. *Molecules*, *28*(6), 2762. <https://doi.org/10.3390/molecules28062762>
- Kolayli, S., Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., & Karaoglu, S. A. (2016). A comparative study of the antihyaluronidase, antiurease, antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of different unifloral degrees of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) honeys. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *31*(sup3), 96–104. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1209494>
- Mendes, F. S. F., Garcia, L. M., Moraes, T. da S., Casemiro, L. A., Alcântara, C. B. de, Ambrósio, S. R., Veneziani, R. C. S., Miranda, M. L. D., & Martins, C. H. G. (2020). Atividade antibacteriana de *Salvia officinalis* L. contra periodontopatógenos: Um estudo in vitro. *Anaerobe*, *63*, 102194. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102194>
- Menezes, T. N. de, Gregório, P. C., Mazarotto, E. J., & Souza, W. M. de. (2024). Capacidade de sobrevivência em diferentes meios e incidência de infecções hospitalares por *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Health Review*, *7*(2), e67947–e67947. <https://doi.org/10.34119/bjhrv7n2-069>

- Millezi, A. F., Baptista, N. N., Caixeta, D. S., Rossoni, D. F., Cardoso, M. G., & Piccoli, R. H. (2014). Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, *16*, 18–24. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722014000100003>
- Mostaqim, S., Saha, S. K., Hani, U., Paul, S. K., Sharmin, M., Basak, S., Begum, S. A., Salma, U., & Shahabuddin, M. S. (2019). Antibacterial Activities of Clove (*Syzygium aromaticum*) Extracts Against Three Food Borne Pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Mymensingh Medical Journal: MMJ*, *28*(4), 779–791.
- Mueller, M., & Tainter, C. R. (2023). *Escherichia coli* Infection. Em *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
- Nakatsuji, T., Chen, T. H., Butcher, A. M., Trzoss, L. L., Nam, S.-J., Karina T. Shirakawa, Wei Zhou, Julia Oh, Michael Otto, O., William Fenical, & Richard L. Gallo. (2018). A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia. *Science Advances*, *4*(2). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao4502>
- Pinto, D., Cádiz-Gurrea, M. de la L., Vallverdú-Queralt, A., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2021). *Conchas de Castanea sativa*: Uma revisão sobre composição fitoquímica, bioatividade e abordagens de gestão de resíduos para valorização industrial. *Food Research International*, *144*, 110364. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110364>
- Porras, G., Chassagne, F., Lyles, J. T., Marquez, L., Dettweiler, M., Salam, A. M., Samarakoon, T., Shabih, S., Farrokhi, D. R., & Quave, C. L. (2021). Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. *Chemical Reviews*, *121*(6), 3495. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00922>

- Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections: An Update. *Drugs*, *81*(18), 2117–2131.  
<https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
- Salma, U., Saha, S. K., Sultana, S., Ahmed, S. M., Haque, S. D., & Mostaqim, S. (2019). The Antibacterial Activity of Ethanolic Extract of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) against two Food Borne Pathogens: Staphylococcus aureus And Escherichia coli. *Mymensingh Medical Journal: MMJ*, *28*(4), 767–772.
- Sandner–Miranda, L., Vinuesa, P., Cravioto, A., & Morales–Espinosa, R. (2018). The Genomic Basis of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in the Genus Serratia. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 353013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00828>
- Santos, M. J., Pinto, T., & Vilela, A. (2022). Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Nutritional and Phenolic Composition Interactions with Chestnut Flavor Physiology. *Foods*, *11*(24), Artigo 24. <https://doi.org/10.3390/foods11244052>
- Severn, M. M., & Horswill, A. R. (2023). Staphylococcus epidermidis and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nature Reviews. Microbiology*, *21*(2), 97–111.  
<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00780-3>
- Silva, V., Falco, V., Dias, M. I., Barros, L., Silva, A., Capita, R., Alonso–Calleja, C., Amaral, J. S., Igrejas, G., Ferreira, I. C. F. R., & Poeta, P. (2020). Evaluation of the phenolic profile of *Castanea sativa* Mill. by–products and their antioxidant and antimicrobial activity against multiresistant bacteria. *Antioxidants*, *9*(1), 87.  
<https://doi.org/10.3390/antiox9010087>
- Sousa, A. T. L. de, Andreza, R. de S., Alves, E. F., Cruz, A. J. F., Leandro, L. M. G., Guedes, T. T. de A. M., Macêdo, R. O. de, Lima, L. F. de, Oliveira–Tintino, C. D. M. de, Coutinho, H. D. M., Tintino, S. R., Sousa, P. C. V. de, & Aquino, P. E. A. de. (2016). Evaluation of the Antibacterial Activity of Methanolic and Hexanic Extracts of Puff Pastry Stem, *Melissa Officinalis* L.

*Revista Ciencias de La Salud*, 14(02), Artigo 02.

<https://doi.org/10.12804/revsalud14.02.2016.05>

Spézia, F. P., Siebert, D., Tenfen, A., Cordova, C. M. M. de, Alberton, M. D., & Guedes, A. (2020).

Avaliação da atividade antibacteriana de plantas medicinais de uso popular:

*Alternanthera brasiliana* (penicilina), *Plantago major* (tansagem), *Arctostaphylos uva-*

*ursi* (uva-ursi) e *Phyllanthus niruri* (quebra-pedra). *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 11.

<https://doi.org/10.5123/s2176-6223202000127>

Tacconelli, E., Carrara, C. E., Alessia Savoldi, Stephan Harbarth, H., Marc Mendelson, Dominique L

Monnet, M., Céline Pulcini, P., Gunnar Kahlmeter, K., Jan Kluytmans, K., Yehuda Carmeli,

C., Marc Ouellette, O., Kevin Outterson, Jean Patel, P., Marco Cavaleri, C., Edward M Cox,

C., Chris R Houchens, H., M Lindsay Grayson, G., Paul Hansen, H., Nalini Singh, ... Nicola

Magrini. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO

priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious*

*Diseases*, 18(3). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2023). Staphylococcus aureus Infection. Em *StatPearls [Internet]*.

StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>

Walker, J., & Moore, G. (2015). Pseudomonas aeruginosa in hospital water systems: Biofilms,

guidelines, and practicalities. *The Journal of Hospital Infection*, 89(4).

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.11.019>

Weber, L., Jansen, M., Krüttgen, A., Buhl, E. M., & Horz, H.-P. (2020). Tackling Intrinsic Antibiotic

Resistance in *Serratia marcescens* with a Combination of Ampicillin/Sulbactam and

Phage SALSA. *Antibiotics*, 9(7), Artigo 7. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070371>

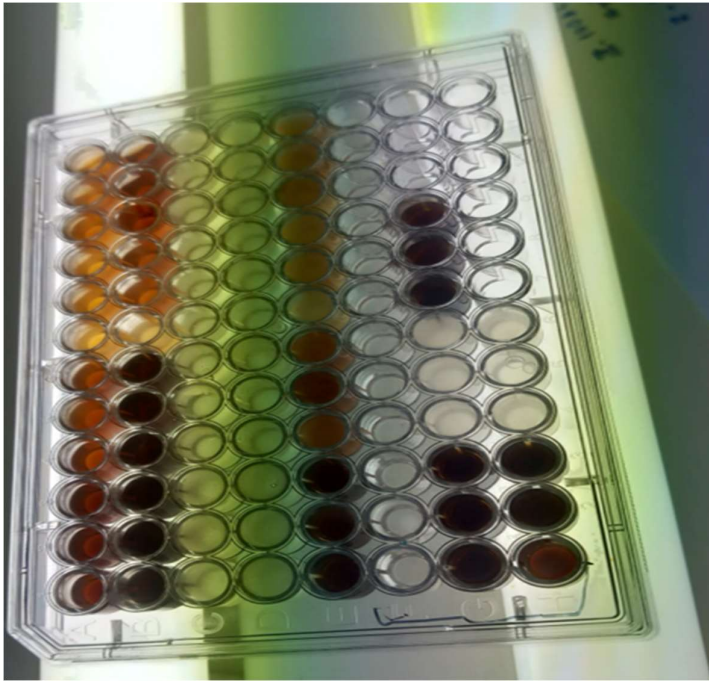
Yin, W., Xu, S., Wang, Y., Zhang, Y., Chou, S.-H., Galperin, M. Y., & He, J. (2021). Ways to control harmful biofilms: Prevention, inhibition, and eradication. *Critical reviews in microbiology*, *47*(1), 57–78. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1842325>

Zaric, R. R. Z., Milan Zaric, M. S., Nenad Zornic, N., Jelena Nesic, J., Vesna Rosic, V., Tatjana Vulovic, T., Marko Spasic, M., Marko Vuleta, M., Jovan Jovanovic, J., Jovanovic, D., Dalibor Jovanovic, S., Stefan Jakovljevic, P., & Petar Canovic. (2023). Antimicrobial Treatment of *Serratia marcescens* Invasive Infections: Systematic Review. *Antibiotics*, *12*(2), Artigo 2. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020367>

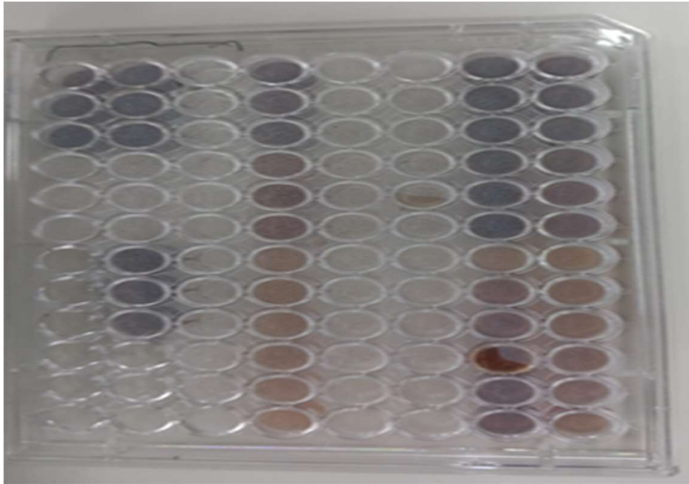
Zhou, W., Spoto, M., Hardy, R., C, G., E, F., Larson, L. P. J., Joseph S. Brown, & Julia Oh. (2020). Host-Specific Evolutionary and Transmission Dynamics Shape the Functional Diversification of *Staphylococcus epidermidis* in Human Skin. *Cell*, *180*(3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.006>

## Anexos

### Anexo I – Resultados das Diluições na Microplaca



*Figura 3 - Resultado de diluições dos poços da microplaca*



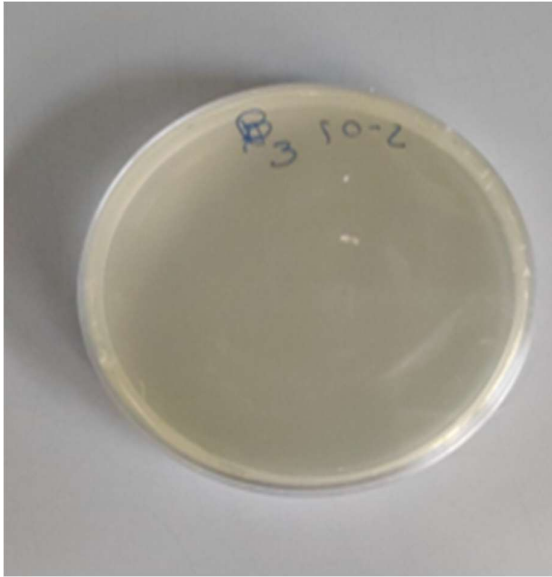
*Figura 4: Outros resultados das diluições dos poços da microplaca*

## Anexo II - Processo de Incubação das Placas de Petri

*Figura 5 - Incubação das placas de Petri*



Anexo III - Resultados de UFC Contáveis com Ouriço e Controle de Meio MH



*Figura 6 -Resultado de UFC contáveis usados com o ouriço*



*Figura 7- Resultados do UFC contáveis usados com controlo de MH*

P.PORTO

ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE



**M** MESTRADO  
FARMÁCIA