



EFEITO INIBITÓRIO *IN VITRO* DO EXTRATO DE *Cunila spicata* CONTRA CEPAS BACTERIANAS DE RELEVÂNCIA CLÍNICA EM SAÚDE PÚBLICA

NOA DUTKEVICZ ^{1,2*}, PRISCILA DEOTTI SIGNOR ³, CAROLINE BALDESSAR DALMOLIN ⁴, SUSANA DE MELLO SCHLEMPER ⁵, VALFREDO SCHLEMPER ^{2,6}

1 Introdução

Segundo Peláez (2006), grande parte dos antibióticos atualmente no mercado tem origem microbiana natural. Com o avanço dos compostos sintéticos, surgiu a carência de novas moléculas que possuam atividade microbiana devido à resistência das cepas bacterianas, gerada pelo uso indiscriminado desses agentes terapêuticos, em humanos e animais. A *Cunila spicata* é um arbusto rasteiro aromático, nativo dos campos de araucárias, comumente conhecida como ‘poejinho’ ou ‘poejo-do-banhado’, de origem sul americana, e encontrada no Uruguai, Argentina e Sul do Brasil. Essa planta apresenta benefícios na medicina tradicional, assim como plantas semelhantes da mesma família. Tem etnoindicação que se deve à capacidade expectorante e antitussígena, infecções pulmonares, bronquite e resfriados. Além de tratamentos de afecções do sistema respiratório, é utilizada em distúrbios digestivos. Ademais, seu extrato mostrou eficiência como anticonvulsivante e inibidor do vírus da estomatite vesicular bovina e é carrapaticida *in vitro* (ECHEVERRIGARAY et al., 2009).

2 Objetivos

Analisar a composição fitoquímica da *C. spicata* e efeito antibacteriano de seu extrato hidroalcoólico nas concentrações de 10, 30, 100 e 400 mg/mL através de testes *in vitro* contra bactérias de interesse clínico.

3 Metodologia

O material vegetal, caules e folhas de *C. spicata*, foram coletados em mata preservada em Bom Retiro-SC e encaminhados para análise taxonômica no Herbário UNOP

1 Acadêmico de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza, contato: noadutkevicz@gmail.com

2 Grupo de Pesquisa: Sanimal – Sanidade Animal

3 Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza

4 Farmacêutica, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul (PPG-SBPAS), Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza.

5 Professora Adjunto, Doutora, Médica veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza.

6 Professor Adjunto, Doutor, Médico veterinário, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza,

Orientador.

Título original do projeto: Efeito inibitório do extrato bruto da *Cunila microcephala* sobre a migração celular induzida por agentes flogísticos nas vias aéreas de camundongos



Unioeste/Cascavel-PR, onde a amostra da exsiccata foi identificada e depositada sob o número UNOP 10171. O extrato hidroalcoólico das partes aéreas da *C. spicata* (EHCS) foi obtido através de extração assistida por ultrassom. Para cada 5 g da planta utilizou-se 100 mL de solvente (etanol a 96%), a solução foi sonicada em sonicador ultrassônico durante 30 minutos (frequência de 65% Hz, ciclo 1). Para condensação e evaporação do extrato, foi submetido ao rotaevaporador (80 a 100°C, 100 rotações por minuto) e colocado em vidros de relógio em estufa a 37°C para secagem. Para análise fitoquímica, o EHCS foi avaliado por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM), conforme Proestos et al. (2006).

Para verificar o efeito antibacteriano do EHCS, foram realizados os testes de difusão em ágar, microdiluição seriada e leitura com corante resazurina, em quatro cepas isoladas de importância clínica, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp., *Escherichia coli* e *Corynebacterium* sp., todas 'wild type'. Na preparação desses inóculos, foi utilizado ágar Mueller Hinton (CMH), preparado para a semeadura em placas de 15 cm de diâmetro, contendo 20 mL do meio. Foi então semeado 0,1 mL da amostra selecionada e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento, 5 colônias isoladas, de aspecto morfológico semelhante, foram retiradas. As colônias escolhidas foram repicadas em 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI), sendo incubadas a 37 °C por 24 horas (NCCLS, 2015).

Para o teste de difusão em ágar, fez-se o uso de placas de Petri, com 20 mL de ágar Mueller Hinton e com cavidades de 5 mm de diâmetro e 10 mm de profundidade, onde foram depositadas as concentrações de 10, 30, 100 e 400 mg/mL do EHCS, ceftiofur 10 mg/mL como controle positivo e PBS (Solução tampão fosfato) como controle negativo. A suspensão dos inóculos já preparada foi padronizada com solução salina até atingir 0,5 na escala de McFarland (EMF), levada ao espectrofotômetro com comprimento de ondas de 625 nm, para alcançar uma média de 2×10^8 (UFC/mL) (NCCLS, 2015). Esse inóculo foi distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar, deixando em repouso à temperatura ambiente, dentro da câmara de fluxo, por aproximadamente 5 minutos e então adicionada à solução teste nas concentrações escolhidas e os controles positivo e negativo das amostras. Depois de prontas, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Decorrido esse período foi realizada a medição dos halos de inibição do crescimento com o auxílio de um paquímetro, o valor foi medido em milímetros do diâmetro do halo, incluindo o diâmetro do poço.

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada a técnica de diluição em microplaca de 96 poços. Cada poço foi preenchido com 80 µL de CMH, 20 µL de inóculo padronizado na EMF 0,5, ainda acrescentados 100 µL de EHCS. Como controle positivo, foi



utilizado Ceftiofur (0,5 mg/mL (100 µL)) com 20 µL de inóculo. Os testes foram realizados em triplicata. Na sequência, as placas foram incubadas a 36 °C durante 24 horas e submetidas à leitura espectrofotométrica em leitor para Elisa, modelo Multiskan GO, no comprimento de onda de 520 nm de absorvância. O cálculo utilizado para se avaliar a porcentagem de inibição foi: % inibição do crescimento microbiano = $[1-(Ac/A0)] \times 100$, onde: Ac representa a média das absorvâncias por concentração de substância testada e já subtraída do valor da absorvância obtida com o controle do extrato. A0 é a média das absorvâncias do controle de crescimento microbiano (sem a substância testada).

Para a leitura com revelador, adicionou-se 30 µL do corante resazurina (0,01%) em cada poço da microplaca, após duas horas, verificou-se a coloração, sendo que azul significa ausência de crescimento bacteriano, enquanto a cor rosa, indica crescimento bacteriano. Os resultados foram agrupados como a média das leituras \pm erro padrão das médias, e comparados os efeitos inibitórios médios do EHCS sobre todas as cepas de microrganismos. Os dados foram analisados por análise de variância ANOVA, e se necessário, comparados pelos testes de Neuman-Keuls ou Dunnet. Os resultados foram considerados significantes quando $P < 0,05$.

4 Resultados e Discussão

Dos 14 compostos identificados pelo cromatograma, dados obtidos pela comparação com os controles demonstram três compostos fenólicos majoritários presentes na planta, 2-bornanode (49,09%), mentofurano (12,78%) e beta-pineno (1,54%). Os resultados da triagem da ação antibacteriana demonstram capacidade do extrato de atuar contra bactérias, tanto Gram positivas como também Gram negativas. No teste antimicrobiano *in vitro* de difusão em ágar, os diâmetros dos halos de inibição e erro padrão das médias para o controle positivo, ceftiofur, foram de 2 ± 0 cm para *E. coli*, para *Corynebacterium* sp. de $1,9 \pm 0,04$ cm, para *Streptococcus* sp. de $2,3 \pm 0,05$ cm e para *S. aureus* $1,6 \pm 0,05$ cm. As concentrações de 10 e 30 mg/mL do EHCS não apresentaram atividade para as 4 cepas bacterianas. O EHCS (100 mg/mL) influenciou na inibição das cepas de acordo com a formação dos halos, para *E. coli* ($1,05 \pm 0,1$ cm), *Corynebacterium* sp. ($0,08 \pm 0,01$ cm) e *Streptococcus* sp. ($0,11 \pm 0,02$ cm), mas não apresentou atividade para *S. aureus*. Na concentração de 400 mg/mL do EHCS, o halo inibição foi de $1,2 \pm 0,08$ cm para as cepas de *Streptococcus* sp., $0,85 \pm 0,07$ cm para *Corynebacterium* sp., $0,45 \pm 0,07$ cm para *E. coli* e inibiu *S. aureus* de com halo de $0,31 \pm 0,05$ cm. Portanto, todos os microrganismos testados apresentaram sensibilidade estatisticamente significantes ($P < 0,05$), para as concentrações de 100 mg/mL e 400 mg/mL, exceto a *S. aureus* com a concentração de 100 mg/mL; dentre os dados da triagem da ação



antibacteriana, o extrato teve o melhor resultado contra a *Streptococcus* sp., quando comparado ao antibiótico de controle positivo Ceftiofur, e produziram-se halos de inibição de diâmetros variáveis dependendo da susceptibilidade de cada cepa. O teste de leitura com revelador resazurina demonstra que houve interferência da coloração do extrato nas duas maiores concentrações testadas. Com isso, se identifica a eficácia antimicrobiana na concentração de 400 mg/mL e inconclusivo até a concentração de 50 mg/mL, sendo que a partir dela denota-se a não inibição de crescimento.

5 Conclusão

A *C. spicata* apresentou como principal composto a cânfora (2-bornanona), que está associada a sua atividade antimicrobiana, e monoterpenos. Houve significativa atividade antibacteriana do EHCS, em especial para *S. aureus* no teste de difusão em ágar e também para *E. coli* quando na CIM, validando assim, pelo menos em parte, o uso popular da *C. spicata* como fitoterápico para o tratamento auxiliar para distúrbios respiratórios infecciosos.

Referências

- PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? **Revista Biochemical Pharmacology**. v. 71, n.7, p. 981-990. 2006. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295205006611>> 20 set., 2019.
- ECHEVERRIGARAY, S. et al. Chemical variations on the essential oils of *Cunila spicata* Benth. (Lamiaceae). **The Journal of Essential Oil Research**, v. 21, p. 241-245, 2009. <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2009.9700159>>. 29 out. 2019.
- PROESTOS, C.; SERELI, D.; KOMAITIS, D. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. **Elsevier**. v. 95, p. 44-52, 2006.
- NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada ANVISA. Ed. M7-A6 do NCCLS, v.23, n.2, 80 p, 2015.
- Palavras-chave:** fitoterapia; antibiótico; poejo-do-banhado; plantas medicinais.
- Financiamento:** Universidade Federal da Fronteira Sul, EDITAL N° 459/GR/UFFS/2019.