

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

GABRIELA SANTOS ALENCAR

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *ACMELLA OLERACEA* (L). R. K. JANSEN
FRENTE Á PATÓGENOS INFECCIOSOS DE IMPORTÂNCIA VETERINÁRIA**

**REALEZA
2021**

GABRIELA SANTOS ALENCAR

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *ACMELLA OLERACEA* (L). R. K. JANSEN
FRENTE A PATÓGENOS INFECCIOSOS DE IMPORTÂNCIA VETERINÁRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do grau de
bacharelado em Medicina Veterinária da Universidade
Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Dr. Fagner Luiz da Costa Freitas

REALEZA

2021

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Alencar, Gabriela Santos
POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ACMEILLA OLERACEA (L). R.
K. JANSEN FRENTE A PATÓGENOS INFECCIOSOS DE IMPORTÂNCIA
VETERINÁRIA / Gabriela Santos Alencar. -- 2021.
31 f.

Orientador: Prof. Dr. Fagner Luiz da Costa Freitas

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina Veterinária, Realeza, PR, 2021.

1. Fitoterapia, Óleo Essencial, Hidrolato, Extrato
bruto.. I. Freitas, Fagner Luiz da Costa, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

GABRIELA SANTOS ALENCAR

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *ACMELLA OLERACEA* (L). R. K. JANSEN
FRENTE A PATÓGENOS INFECCIOSOS DE IMPORTÂNCIA VETERINÁRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do grau de
bacharelado em Medicina Veterinária da Universidade
Federal da Fronteira Sul.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 31/08/2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Tatiana Champion – UFFS
Presidente da banca

Profa. Dra. Susana Regina de Mello Schlemper – UFFS
Membro titular



Ms. Adriano Fávero – UFFS
Membro titular

Dedico este trabalho a minha família, meus amigos e a Deus que me capacita todos os dias a ser alguém melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar ao meu lado e me proteger em todos os momentos.

Agradeço a minha família por seu apoio incondicional e amor acima de tudo.

Agradeço ainda aos meus amigos por me acolherem e apoiarem em toda a minha jornada.

RESUMO

O uso de antimicrobianos indiscriminadamente tende a levar a aquisição de mecanismos de resistência por parte dos microrganismos o que acaba promovendo um aumento de morbidade e mortalidade entre pessoas e animais. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de tratamentos alternativos adjuvantes a essas doenças a fim de auxiliar os pacientes na promoção de alternativas aos tratamentos alopáticos pré-existentes. Este trabalho avaliou o potencial antimicrobiano do jambu (*Acmella oleracea*), nativo da Amazônia, cultivado em condições climáticas do sudoeste paranaense. A pesquisa realizou-se nas Áreas Experimentais da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), do campus Realeza, no estado do Paraná. A coleta das sementes de jambu foi realizada no município de Macapá, Amapá, precedida da preparação do solo utilizando adubação orgânica, o plantio, a colheita, dessecação, posterior trituração e obtenção do Extrato Bruto (EBAc) através de extração alcoólica. A fim de extrair o Óleo Essencial (OEAc) e o Hidrolato (HIAc) do jambu utilizaram-se diferentes técnicas de destilação, sendo posteriormente avaliados contra alguns patógenos de origem microbiana importantes em medicina veterinária e utilizando-se dos testes de disco-difusão (Kirby-Bauer), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) ou concentração fungicida mínima (CFM), para bactérias e fungos, respectivamente, seus dados foram avaliados utilizando-se o teste de Scott-Knott. Os resultados encontrados sugerem que os compostos do jambu têm significativo efeito antimicrobiano "in vitro", principalmente com relação aos fungos, o que corrobora dados já pré-existentes sobre o uso do jambu e viabiliza a realização de testes "in vivo" a serem realizados futuramente.

Palavras-chave: Jambu. Fitoterapia. Óleo essencial. Extrato bruto. Hidrolato.

ABSTRACT

The indiscriminate use of antimicrobials tends to lead to the acquisition of resistance mechanisms by microorganisms, which ends up promoting an increase in morbidity and mortality among people and animals. Therefore, it is necessary to develop adjuvant alternative treatments for these diseases in order to assist patients in promoting alternatives to pre-existing allopathic treatments. This work evaluated the antimicrobial potential of jambu (*Acmella oleracea*), native to the Amazon, cultivated under climatic conditions in southwestern Paraná. The research was carried out in the Experimental Areas of the Federal University of Fronteira Sul (UFFS), on the Realeza campus, in the state of Paraná. The collection of jambu seeds was carried out in the city of Macapá, Amapá, preceded by soil preparation using organic fertilization, planting, harvesting, desiccation, subsequent crushing and obtaining the Gross Extract (EBAc) through alcoholic extraction. In order to extract the Essential Oil (OEAc) and the Hydrolate (HIAc) from the jambu, different distillation techniques were used, which were later evaluated against some pathogens of microbial origin important in veterinary medicine and using disk-diffusion tests (Kirby-Bauer), minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (CBM) or minimum fungicidal concentration (CFM), for bacteria and fungi, respectively. Which were later quantified by the serial microdilution methodology and their data were evaluated using the Scott-Knott test. The results found suggest that jambu compounds have a significant “in vitro” antimicrobial effect, especially with regard to fungi, which corroborates pre-existing data on the use of jambu and makes it possible to carry out “in vivo” tests to be performed in the future.

Keywords: Jambu. Phytotherapy. Essential oil. Crude extract. Hydrolate.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Diâmetro médio dos halos inibitórios formados de acordo com cada cepa bacteriana (mm).....22
- Tabela 2 – Percentual de dose necessária para CIM e CBM das bactérias (%)23
- Tabela 3 – Diâmetro médio dos halos inibitórios de acordo com cada cepa fúngica (mm)24
- Tabela 4 – Percentual de dose necessária para CIM e CFM dos fungos utilizados (%).....25
- Tabela 5 – Média da quantidade de composto utilizado para inibição ou morte dos microrganismos (%)26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
EBAc	Extrato Bruto de <i>Acmella Oleracea</i>
HIAc	Hidrolato de <i>Acmella Oleracea</i>
OEAc	Óleo essencial de <i>Acmella Oleracea</i>
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVO GERAL.....	14
1.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	14
2	REVISÃO LITERÁRIA	15
3	METODOLOGIA	17
3.1	SEPARAÇÃO E PREPARO.....	17
3.2	EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	17
3.3	SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	17
3.4	PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS.....	18
3.5	PADRONIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	18
3.6	TÉCNICA DE DISCO-DIFUSÃO.....	18
3.7	CBM E CFM.....	19
3.8	CIM.....	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
6	REFERENCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

Tem-se buscado alternativas para o uso de medicamentos alopáticos, seja para complementar um tratamento ou mesmo realizá-lo em sua totalidade, diminuindo assim a carga artificial dos medicamentos alopáticos e seus efeitos colaterais, sem comprometer a eficácia do tratamento. O uso de medicamentos fitoterápicos, que são aqueles cuja matéria prima deriva de uma planta com potencial medicinal conhecido (PIRES et al., 2014), tem crescido muito devido ao seu alto potencial terapêutico (MENESES et al., 2018), versatilidade, baixo custo e fácil acessibilidade (PORSANI et al., 2016).

O jambu (*A. oleraceae*) é uma planta herbácea, de pequeno porte, que possui hastes rasteiras e ramificadas e pertence à família Asteraceae (RODRIGUES et al., 2016). No Brasil, essa planta é proveniente da Amazônia oriental, e também está presente no Amapá e Pará, tratando-se de uma planta perene e anual, que apresenta notável exigência hídrica e se adapta melhor a climas quentes e úmidos (CHENG et al., 2015). É utilizada, principalmente, para fins culinários e na medicina popular local, tendo como principais aplicações o uso em dores de dente, de estômago, anemias, reumatismo, tuberculose, além do seu uso na forma de tempero em pratos típicos como o pato no tucupi e tacacá (NEVES, 2016). Foram encontrados ainda trabalhos que relatam seu uso apresentando resultados positivos como antitussígeno em ratos (MELLO e MELLO, 2007), para controle de ectoparasitos e endoparasitos na bovinocultura (SPRENGER et al., 2015), cicatrizante em cães (PORSANI et al., 2016), na piscicultura como anti-helmíntico (MENESES et al., 2018) e como tratamento alternativo para gatos obstruídos (TREVISAN et al., 2016). De acordo com Borges et al. (2016), possui ação antinociceptiva, inseticida, antimicrobiana, antifúngica, além de atuar como anestésico local e prevenir a formação de radicais livres. Destaca-se ainda por apresentar efeitos antioxidantes, antimutagênicos, neuroprotetores e antineoplásicos (BARBOSA et al., 2016), sendo alvo de interesse das indústrias farmacêuticas, de cosméticos, de medicamentos e alimentos (NAKATANI e NAGASHIMA, 2014).

Em sua composição, podem ser encontradas diversas substâncias químicas que justificam ampla utilização, destacando-se o espilantol, trans-cariofileno, d-germacreno, l-dodeceno e espatulenol (BORGES et al., 2016; YAMANE et

al, 2016). O espilantol, devido a sua ação bactericida e antifúngica, favorece tratamentos de afecções relacionadas a patógenos da pele, além de promover aumento da velocidade do processo de cicatrização (HUANG et al, 2019).

Sua ação bactericida se dá em maior proporção com o uso do EBAC, que é obtido por extração alcoólica, seguida de evaporação do solvente utilizado, sendo o hexano, o composto alcoólico de uso mais comum nesse processo, o que potencializa a seu efeito antibacteriano (FRANCA et al., 2016). Sua ação é de amplo espectro, sendo utilizado contra as seguintes cepas: *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Salmonella dysenteriae*, *Vibrio mimicus* e *Vibrio parahaemolyticus*, apresentando ação antibacteriana de moderada a significativa em todas as culturas testadas (AHMED et al., 2012). Já sua propriedade antifúngica, dá-se pela ação do OEAC extraído da flor que é a porção com maior concentração dessa substância, sendo capaz de inibir algumas espécies fúngicas como *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium moniliformi* (DUBEY et al, 2013).

Pode-se ainda utilizar outras técnicas com a finalidade de auxiliar a obtenção de resultados que carecem na literatura sobre o jambu como os testes de CIM, que seleciona a menor concentração do princípio ativo capaz de inibir o microorganismo, sendo realizada a leitura desses resultados utilizando o espectrofotômetro e comparando a absorbância em cada um dos micropoços obtidos. Tem-se ainda o teste de CBM ou CFM que por sua vez considera a menor concentração dos compostos utilizados que seja capaz de causar a morte dos microrganismos, para isso utiliza-se um composto auxiliar para visualização de viabilidade celular, sendo necessária para realização de ambas as técnicas a realização de microdiluição seriada prévia (MAGALHÃES et al., 2017).

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi estudar o potencial antimicrobiano de *A. oleraceae* contra patógenos infecciosos de importância veterinária.

1.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

O objetivo específico foi avaliar a ação do OEAc, HAc e do EBAc contra bactérias e fungos de importância veterinária, por meio dos testes de Difusão em disco (Kirby-Bauer), CIM e CBM ou CFM.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O jambu (*A. oleraceae*) é uma planta herbácea, de pequeno porte, que possui hastes rasteiras e ramificadas, pertence à família Asteraceae e ao gênero *Acmella*, é comumente encontrada na região das Américas e África. Por tratar-se de uma planta com elevado teor de umidade, fica sujeita a uma vida útil diminuída, para contornar tal situação pode-se utilizar processos que promovam sua secagem e acomodação adequada, a fim de evitar a diminuição de suas propriedades microbiológicas, preservar suas reações enzimáticas e físicas, além de diminuir seu peso e volume, facilitando assim o seu transporte (BARBOSA et al, 2016).

É bastante utilizada na cultura local, tendo como principais aplicações o uso na medicina local e em forma de tempero em pratos típicos como o pato no tucupi e tacacá, possui sabor apimentado e é capaz de causar uma sensação de dormência na cavidade oral ao ser ingerida (NEVES, 2016). Sendo ainda objeto de interesse das indústrias farmacêuticas, de cosméticos, de medicamentos e alimentos, pois, devido a sua ampla aplicação pode ser utilizado na formulação de cremes dentais, cremes antirrugas, suavizantes, chicletes, entre outros (NAKATANI e NAGASHIMA, 2014).

Em sua composição podem ser encontradas diversas substâncias químicas que justificam uma ampla utilização, destacando-se o espilantol, trans-cariofileno, germacreno D, l-dodeceno e espatulenol (BORGES et al, 2016). Dentre estas, o espilantol é a mais utilizada, seguido do trans-cariofileno e do germacreno-D, sendo ambas as substâncias encontradas em grande quantidade na planta (BORGES et al, 2012), o espilantol destaca-se devido a sua ação bactericida e antifúngica (HUANG et al, 2019), além de sua aplicação no controle biológico de culturas (BORGES et al, 2012).

Estudos realizados sob a forma de análise sensorial e química indicam que as propriedades antimicrobianas se mantêm mesmo após o processo de secagem e utilização do produto em composições alimentícias, inibindo o crescimento de *Salmonella spp.* e diminuindo consideravelmente a presença de coliformes e estafilococos coagulase positivo, sem promover alterações de sabor, cor, aroma ou textura dos alimentos (BARBOSA et al, 2016). Além disso, pode auxiliar o tratamento de bacteremias e fungemias decorrentes de mucosite em pacientes que fazem quimioterapia, aliviando os sintomas, atuando na recomposição da microbiota, e

mostrando-se assim com notável potencial para prevenir e tratar tais afecções (FREITAS-BLANCO et al, 2019).

Sua ação antifúngica é relatada em diversos estudos, apresentando efeito fungistático com a inibição do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando uma dose de 25 µg/mL de OEAc (MOLINA-TORRES; GARCIA-CHAVEZ; RAMIREZ-CHAVEZ, 1999), e fungicida contra *Fusarium oxysporium*, *Fusarium moniliformis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus paraciticus* (RANI e MURTY, 2006), e *Candida albicans* (AHMED et al, 2012), sendo em ambos os testes utilizado o método de disco difusão ou Kirby-Bauer, que avalia a formação de halos inibitórios em cada placa de Petri, sendo o tamanho dos halos diretamente proporcional a quantidade de espilantol em cada fração extraída do-jambu (RANI e MURTY, 2006).

Sua ação bactericida se dá em maior proporção com o uso do EBAc, esta ação é de amplo espectro, sendo utilizado contra as seguintes cepas: *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio mimicus* e *Vibrio parahemolyticus*, apresentando ação antibacteriana de moderada a significativa em todas as culturas testadas. Para realização dos testes, as bactérias foram cultivadas em ágar nutriente, sendo mantidas em estufa por 24 horas, e posteriormente realizou-se teste de Disco-difusão em cada cultura, avaliando-se o halo inibitório formado (AHMED et al, 2012).

Pode-se ainda utilizar outras técnicas com a finalidade de auxiliar a obtenção de resultados que carecem na literatura sobre o-jambu, como os testes de CIM que seleciona a menor concentração do princípio ativo capaz de inibir totalmente o crescimento microbiano, sendo realizada leitura desses resultados utilizando o espectrofotômetro e comparando a absorbância em cada um dos micropoços obtidos, e o teste CBM ou CFM, que por sua vez considera a menor concentração dos compostos utilizados que seja capaz de impedir o crescimento bacteriano e fúngico visível, para isso utiliza-se um composto auxiliar para visualização de viabilidade celular, sendo necessária para realização de ambas as técnicas a realização de microdiluição seriada prévia (MAGALHÃES et al, 2017).

3 METODOLOGIA

3.1 SEPARAÇÃO E PREPARO

Após a separação das sementes do jambu, seguiu-se com a preparação das mudas, que foram acondicionadas em estufa localizada nas áreas experimentais da UFFS Realeza e posteriormente foram realocadas para os canteiros experimentais localizados no mesmo lugar. Por um período de aproximadamente três meses a planta cresceu e posterior a isso foi realizada a colheita das plantas, assim como sua separação em caule, folhas e flores, pesagem, dessecação e trituração.

3.2 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS

Posterior a esse processo deu-se início a extração dos compostos derivados do jambu, começando por aqueles em que a extração pode ser feita a partir do seu aquecimento, com uso de aparelho de destilação comum e balão volumétrico, que nesse caso foram o OEAc e o HIAc. Para tanto, utilizou-se um aparelho de Clevenger, no qual os caules e folhas triturados foram acondicionados na região do extrator juntamente com uma parcela de água, sendo aquecidos a cem graus Celsius, e posteriormente sofrendo um resfriamento gradual o que possibilita que elas alcancem o balão volumétrico em seu estado líquido, diferindo entre si em termos de coloração e densidade, sendo o OEAc a substância sobrenadante enquanto o HIAc se localiza mais ao fundo e em maior quantidade. Já a obtenção EBAC-deu-se de maneira diferente e em parceria com o Laboratório de Química da UFFS. Para esse procedimento foram usadas as flores do jambu, sua obtenção deu-se através de extração alcoólica em aparelho Soxhlet por 24 horas, seguida de evaporação do solvente em rotaevaporador.

3.3 SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A partir de microrganismos disponibilizados pelo laboratório da UFFS, foram utilizadas bactérias Gram positivas e negativas, além de cepas fúngicas para o experimento. As bactérias Gram positivas selecionadas foram: *Streptococcus uberis*,

S. pyogenes, *S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus* (cepas NP23, LB25923, B24 e NP38), *S. epidermidis* e *Enterococcus faecalis*; e as bactérias Gram negativas foram: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Shigella flexneri* NP122, *Escherichia coli* (cepas NP22 e ATCC25922). As cepas fúngicas utilizadas para o trabalho foram: *Candida glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus gattii* 178 e *C. gattii* 179.

3.4 PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS

Para a preparação do inóculo confeccionou-se caldo nutriente para ambas as culturas, posteriormente houve a alocação dos fungos em estufa para crescimento, sob a temperatura de 28 °C durante 48 horas, enquanto para as bactérias realizou-se o mesmo processo diferindo apenas na temperatura utilizada e no tempo de incubação, que nesse caso foram 37 °C por 24 horas.

3.5 PADRONIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

A padronização dos microrganismos foi realizada visando alcançar 0.5 na escala McFarland. Para isso, a densidade dos inóculos foi ajustada utilizando NaCl 0,9%. Para confirmação da densidade, utilizou-se o espectrofotômetro (Thermo scientific, Brasil), com leitura em comprimento de onda de 595 nm. O inóculo foi ajustado até alcançar a faixa de absorbância entre 0,080 a 0,130 angstroms, nos mostrando uma densidade aproximada de $1 \text{ à } 1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

3.6 TÉCNICA DE DISCO-DIFUSÃO

Após selecionados os microrganismos, realizou-se o preparo das placas com ágar para crescimento biológico de cada cepa, utilizando o método de Kirby-Bauer ou método semiquantitativo baseado na difusão em disco (BAUER et al., 1966; AHMED et al., 2012). O meio de cultura utilizado para as bactérias foi o ágar Mueller-Hinton e para os fungos, o ágar Sabouraud, por propiciar um crescimento não seletivo dos microrganismos.

O plaqueamento foi realizado em triplicata, garantindo maior confiabilidade no processo. As estrias foram obtidas com o auxílio de um swab, sendo utilizados três discos de algodão em cada placa contendo 5 µg de OEAc, EBAC e HIAC de *A. oleraceae*. Além disso, utilizou-se um disco para controle com Ciprofloxacino, um antibiótico de amplo espectro para as bactérias e Miconazol, para os fungos.

Ao fim deste processo, as placas foram levadas à estufa por 24 horas a 37 °C e 48 horas a 28 °C, para crescimento das bactérias e fungos, respectivamente. Posteriormente, realizou-se a mensuração dos halos inibitórios formados nas placas com o auxílio de paquímetro e lupa.

Os resultados obtidos da fase de mensuração dos halos foram utilizados como fator de seleção dos microrganismos para realização do teste de CIM e CBM ou CFM, sendo considerados somente aqueles que apresentarem resultado positivo, ou seja, os que apresentaram formação de halo inibitório superior a 8 mm foram utilizados para determinar a sensibilidade bacteriana e fúngica.

3.7 CBM E CFM

Foram realizados os testes de CIM e CBM ou CFM, pela metodologia de microdiluição seriada. Para realização desses testes foi necessária a preparação de microplacas, com deposição de 150µL de caldo Mueller-Hinton em todos os 96 poços. O microrganismo selecionado e cada um dos compostos de jambu OEAc, EBAC e HIAC, com os quais realizou-se a microdiluição seriada, seguiu a seguinte disposição: na primeira coluna não incluía os derivados antimicrobianos, na segunda coluna a maior concentração, de modo que cada coluna subsequente apresentava metade da concentração do composto testado. Em seguida foi feita a incubação das placas seguindo o mesmo tempo e temperatura de crescimento conforme descrito anteriormente. Após crescimento, efetuou-se a leitura das placas com auxílio do leitor de Elisa, sendo considerada como valor de CIM a primeira linha a obter resultados presuntivos de inibição, como a diminuição da quantidade de microrganismos presentes na microplaca em relação aos poços anteriores.

3.8 CIM

As microplacas passaram por outra etapa nesse processo, desta vez para avaliar microrganismos viáveis. Para tanto, utilizou-se uma solução como indicador de viabilidade celular, sendo composta por Resazurina diluída em água destilada. A solução preparada foi depositada nos micropoços. Após esse processo esperou-se por 10 a 20 minutos para análise das placas, sendo observadas mudanças de cor nos poços, nas quais a coloração azul indicava inviabilidade, e a rosa demonstrava viabilidade celular. Dessa forma, o ponto em que as linhas começavam a adquirir a coloração rosa, designou o ponto em que ocorre a CBM ou fungicida mínima. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do cálculo da variância, apresentando resultados significativos acerca da eficácia dos derivados do jambu como antimicrobianos potenciais, que serão discutidos no tópico posterior.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos derivados do jambu não apresentam efeito bactericida ou bacteriostático em todas as cepas testadas, sendo seu efeito insuficiente ou nulo para *S. agalactiae* e *E. coli* 25922, o que levou a exclusão dessas bactérias do resultado final (Tabela 1). Algumas cepas não apresentaram crescimento durante a fase experimental, sendo elas a *E. coli* NP22 e *S. uberis*, tal fato deve-se provavelmente à inviabilidade das culturas utilizadas, o que levou a exclusão delas do trabalho. Foram devidamente testadas somente aquelas que após a semeadura apresentaram formação de halo de inibição, sendo elas: *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. flexneri*, *S. aureus* B24, *S. aureus* NP38 e *S. aureus* ATCC 25922.

Vale destacar que nem todas as bactérias utilizadas aqui possuem comprovação de eficácia científica na realização de testes envolvendo *A. oleraceae*, dessa forma a literatura carece de maiores informações acerca desses tópicos. Dentre os microrganismos selecionados possuíam respaldo científico *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *S. aureus* e *E. coli*, que segundo AHMED et al, 2013, a realização dos mesmos testes aqui propostos, diferindo apenas em quantidade e controle gerou resultados promissores apresentando inibição das cepas apresentadas.

Na literatura encontram-se dados da ação antimicrobiana de folhas da planta *A. oleraceae* em oito bactérias, dentre elas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, indicando potencial de extratos de metanol das flores e folhas contra patógenos bacterianos (BORATE e DISALE, 2013). Ainda, trabalhos realizados com extratos metanólicos da planta demonstraram atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Em contrapartida, o estudo denota atividade bacteriostática contra *Escherichia coli* e *Candida albicans* (NEVES, 2018).

Para a realização dos testes de caráter microbiológico foi utilizado o método de Kirby-Bauer ou difusão em disco, que avalia a formação dos halos inibitórios (BAUER et al., 1966), nesse caso, o HIAC não foi capaz de formar halo inibitório em nenhuma das colônias selecionadas. O OEAc formou halos mais discretos em relação ao EBAC, que por sua vez obteve os resultados mais satisfatórios em todas as cepas. O OEAc não foi capaz de formar halo nas seguintes colônias: *S. epidermidis*, *S. flexneri* e *S. aureus* 25923. O EBAC apresentou maior crescimento de halo nas seguintes colônias: *E. faecalis*, *S. aureus* 25923, *S. aureus* B24 e *S. flexneri*, respectivamente (Tabela 1).

Segundo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, o Ciprofloxacino como antibiótico de amplo espectro apresenta pontos de corte de CIM e valores dos halos inibitórios utilizando a concentração de 5 µg do princípio ativo (BrCAST, 2019). Para *Enterococcus* spp. obteve-se o valor de 22 mm, *Enterobactérias* e *Pseudomonas* spp. 26 mm e *Staphylococcus* spp. 21 mm, números que são relativamente menores aos obtidos por este trabalho (Tabela 1). Tal fato pode ser justificado pela concentração de princípio ativo utilizado duas vezes maior, os meios de cultura que influenciam no gradiente de dispersão no meio, e os microrganismos, que neste caso, são cepas conhecidas que não possuem genética de resistência.

Tabela 1 – Diâmetro médio dos halos inibitórios formados de acordo com cada cepa bacteriana (mm)

Microrganismos	Diâmetro do halo inibitório formado para as cepas bacterianas em milímetros (mm)			
	OEA _c	HIA _c	EBA _c	Ciprofloxacino
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0	0	36,0 ± 1,0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	5,66 + 3,44	32,33 ± 3,33 ↔ 5,67
<i>Staphylococcus aureus</i> NP38	4,25 ± 4,75	0	6,5 ± 1,5 ↔ 4,5	38,5 ± 3,5 ↔ 5,5
<i>S.aureus</i> LB25923	0	0	8,75 ± 0,75 ↔ 0,25	35,25 ± 2,25 ↔ 2,75
<i>S.aureus</i> B24	4,0 ± 4,0	0	8,5 ± 0,5	34,5 ± 2,0 ↔ 2,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	8,0	0	10,0 ± 2,0 ↔ 1,0	35,0 ± 1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	10,0	0	6,0 + 2,0	37,75 ± 4,75 ↔ 4,25
<i>Shigella flexneri</i>	0	0	8,33 ± 0,33 ↔ 0,67	36,66 ± 0,66 ↔ 1,34
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	0	0	0	47,33 ± 0,33 ↔ 0,67

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Com relação à leitura no Elisa, pode-se constatar que, de modo geral, para que haja um efeito satisfatório de inibição das bactérias é necessário que seja utilizada a dose máxima dos compostos derivados do jambu (100% = 0,150 µL), com

exceção das seguintes placas: *S. flexneri*, *S. aureus* B24 e *P. aeruginosa*, que apresentaram resultado positivo até a terceira coluna, na qual apresenta 0,075µL. Com relação a ação do OEAc essa mostra-se mais expressiva na leitura com Elisa, acredita-se que haja essa discrepância de resultados em relação ao teste de halo inibitório devido a variação da capacidade de dispersão do óleo no meio (Tabela 2). O teste CIM confirma os resultados anteriores.

Tabela 2 – Percentual de dose necessária para CIM e CBM das bactérias (%)

Microrganismos	Percentual de dose necessária para inibição das bactérias utilizadas (%):					
	OEAc		HIAc		EBAc	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Streptococcus agalactiae</i>	n.i*	n.i*	n.i*	n.i*	n.i*	n.i*
<i>S. epidermidis</i>	100%	100%	100%	100%	25%	25%
<i>Staphylococcus aureus</i> NP38	100%	100%	50%	50%	50%	50%
<i>S.aureus</i> LB25923	100%	100%	50%	50%	50%	50%
<i>S.aureus</i> B24	100%	100%	50%	50%	25%	25%
<i>Enterococcus faecalis</i>	50%	50%	50%	50%	25%	25%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	100%	100%	50%	50%	12,5%	12,5%
<i>Shigella flexneri</i>	50%	50%	100%	100%	50%	6,25%
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	n.i*	n.i*	n.i*	n.i*	n.i*	n.i*

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Em n.i* lê-se não houve inibição.

Já com relação aos fungos, compostos derivados do jambu apresentam resultados significativos contra *Candida albicans*, utilizando metodologia semelhante à proposta neste estudo (NEVES, 2018; AHMED et al, 2013). Para os demais fungos a literatura carece de informações pertinentes a respeito, fazendo-se necessários

assim novos estudos que apresentem dados mais amplos sobre esse tópico. Após a realização dos testes pode-se constatar as seguintes reações: Os compostos derivados do jambu apresentaram resultado mais satisfatório como antifúngico em relação aos resultados obtidos com antibacterianos. Com relação a formação dos halos, o HIAc não foi capaz de formar halo inibitório em nenhuma das colônias selecionadas. O OEAc não foi capaz de formar halo em nenhuma das cepas do gênero *Cryptococcus* utilizadas e nem na *Candida glabrata*. O halo formado nas demais era muito discreto. Os melhores resultados são atribuídos ao EBAC, que foi capaz de formar halo em todas as colônias, sendo os maiores deles nas colônias de *C. gatti 179* e *C. tropicalis*, respectivamente. E a ação mais branda ocorreu na *C. glabrata*, as demais obtiveram resultados semelhantes entre si.

Tabela 3 – Diâmetro dos halos inibitórios formados de acordo com cada cepa fúngica (mm)

Microrganismos	Diâmetro do halo inibitório formado para as cepas bacterianas em milímetros (mm)			
	OEAc	HIAc	EBAc	Miconazol
<i>Candida glabrata</i>	0	0	8,25 ± 2,75	47,0 ± 2,0
<i>C. tropicalis</i>	2,1 ± 2,3 ↔ 6,5	0	10,25 ± 1,25 ↔ 1,75	47,33 ± 0,33 ↔ 0,67
<i>C. parapsilosis</i>	2,5 ± 2,5 ↔ 7,5	0	10,5 ± 0,5 ↔ 7,5	40 ± 2,25 ↔ 3
<i>Criptococcus gattii 178</i>	0	0	10,0 ± 1,0 ↔ 1,0	36,0 ± 1,0
<i>C. gattii 179</i>	0	0	11,0 ± 2,0 ↔ 1,0	35,0 ± 3,0 ↔ 1,0

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Com relação às leituras de Elisa, pode-se constatar que, de modo geral, todos os compostos utilizados apresentaram ação antifúngica, com graus variados. O HIAc apresentou-se eficaz quando utilizado na sua dose máxima, com exceção do *C. gattii 179*, no qual ele consegue apresentar efeito mesmo com metade de sua dose inicial. O do OEAc apresentou resultados melhores como antifúngico do que como antibacteriano, sendo capaz de inibir *C. glabrata* mesmo com baixas porcentagens em relação a sua dose inicial, agindo somente em dose máxima na *C. tropicalis*. Para as demais, houve resultado nas doses variáveis. Já o EBAC apresentou ação mais discreta em relação à apresentada no teste antibacteriano. Seu melhor

resultado foi contra *C. gattii* 179, sendo capaz de causar inibição mesmo com 12,5% de sua dose inicial. Logo, pode-se concluir que o EBAC age de forma mais eficiente como antibacteriano, já o do OEAC é mais efetivo como antifúngico (Tabela 4).

Tabela 4 – Percentual de dose necessária para CIM e CFM dos fungos utilizados (%)

Microrganismos	Percentual de dose necessária para inibição das bactérias utilizadas (%):					
	OEAC		HIAc		EBAC	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Candida glabrata</i>	25%	25%	100%	100%	6,25%	6,25%
<i>C. tropicalis</i>	100%	100%	100%	100%	12,5%	12,5%
<i>C. parapsilosis</i>	25%	25%	100%	100%	12,5%	12,5%
<i>Criptococcus gattii</i> 178	100%	100%	50%	50%	12,5%	12,5%
<i>C. gattii</i> 179	25%	50%	50%	100%	12,5%	12,5%

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Com relação ao percentual de doses necessária aplicado às bactérias, pode-se inferir que nesse experimento, o EBAC expressou esse potencial contra aproximadamente 78,0% das cepas utilizadas, sendo efetivo tanto para bactérias gram negativas quanto para gram positivas, sendo dentre as frações do jambu utilizadas a que apresenta resultados com a menor dose utilizada, sendo efetivo na dose de 25% (33,3% dos microrganismos), e até 12,5% (11,1% dos microrganismos). Já o do OEAC mostrou-se eficaz contra 77,7% das cepas utilizadas, enquanto o HIAc apresentou-se eficaz contra 77,7% das cepas bacterianas, sendo suficiente para causar inibição com 50% da dose inicial em 55,5% delas.

Já para os fungos obtiveram-se os seguintes resultados: os compostos utilizados apresentaram resultados positivos para todas as cepas utilizadas, dentre eles, as menores doses necessárias para surtir efeitos de inibição e/ou morte dos microrganismos foram associadas ao EBAC, apresentando médias de inibição de 6,25% á 12,5% da dose inicial utilizada. Os demais compostos apresentaram doses de efeito variando entre 25% e 100%.

Tabela 5 – Média da quantidade de composto utilizado para inibição ou morte dos microrganismos (%)

Microrganismos	Média da quantidade de composto utilizado para inibição ou morte dos microrganismos (%)			
	Bactérias		Fungos	
	CIM	CBM	CIM	CFM
OEAc	62,50%	68,75%	55,55%	60,00%
EBAc	23,43%	17,96%	11,25%	11,25%
HIAc	50,00%	50,00%	80,00%	90,00%

Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A análise dos resultados obtidos neste experimento nos leva a inferir que, dentre as frações extraídas do jambu, o composto com maior eficácia foi o EBAC. Acredita-se que os demais compostos, ao serem aquecidos, sofrem desnaturação de várias proteínas que os compõem, o que, nesse caso, aparentemente diminui seu efeito inibitório. Como o processo utilizado para obtenção do EBAC não envolve aquecimento, logo, ele acaba apresentando um melhor desempenho. Vale destacar que o EBAC apresenta em sua composição um misto das substâncias utilizadas e de outros componentes do-jambu, o que pode também contribuir positivamente para seu potencial antimicrobiano.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que todas as frações extraídas do jambu apresentaram em algum grau promissores efeitos antifúngicos e antibacterianos, destacando-se a ação do como potente antifúngico e do EBAC como antibacteriano, enquanto o HIAC mostrou efeito moderado para ambos os microrganismos. Evidenciando dessa forma sua aplicação como possível tratamento alternativo ou complementar antimicrobiano de origem natural, diminuindo a carga química ingerida derivada de medicamentos alopáticos e possibilitando, de acordo com o desenvolvimento de estudos posteriores, seu uso em pessoas e animais. Vale destacar que se faz necessário o desenvolvimento de pesquisas para melhor elucidar seus efeitos “in vivo” e “in vitro” fazendo uso de cepas isoladas de casos clínicos, assim como a verificação da viabilidade econômica relacionada à produção de produtos fitoterápicos, a junção desses fatores é essencial para que se possa ter um conhecimento cada vez mais abrangente dos efeitos da *A. oleraceae*.

6 REFERÊNCIAS

Ahmed, S., Rahman, A., Muslim, T., Sohrab, M., Akbor, M., Siraj, S., Sultana, N., & Al-Mansur, M. (2013). **Antimicrobial cytotoxicity and phytochemical activities of *Spilanthes acmella***. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*,47(4), 437–440. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v47i4.14073>.

BARBOSA, Alan Franco et al. **Microbiological and sensory evaluation of Jambu (*Acmella oleracea* L.) dried by cold air circulation**. *Food Science and Technology (Campinas)* [online]. 2016, v. 36, n. 1 [Accessed 5 September 2021] , pp. 24-29. Available from: <<https://doi.org/10.1590/1678-457X.6827>>. Epub 19 Jan 2016. ISSN 1678-457X. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6827>.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. *Am J Clin Pathol*. 1966 Apr;45(4):493-6. PMID: 5325707.

BORATE[P.P.; Disale S.D. (2013). **Studies on antibacterial activity of *Acmella oleracea* (L.) Murr**. *International Journal of Pharmaceutical Science and Health Care*,3(5)36-42. https://www.academia.edu/8443889/Studies_on_Antibacterial_Activity_of_Acmella_oleracea_L_Murr.

Luciana da S. Borges, Maria A.R. Vieira, Marcia O.M. Marques, Fabio Vianello and Giuseppina P.P. Lima, 2012. **Influence of Organic and Mineral Soil Fertilization on Essential Oil of *Spilanthes oleracea* cv. Jambuarana**. *American Journal of Plant Physiology*, 7: 135-142. DOI: [10.3923/ajpp.2012.135.142](https://doi.org/10.3923/ajpp.2012.135.142)

Luciana da Silva Borges, Marizete Cavalcante de Souza Vieira, Fabio Vianello, Romy Goto & Giuseppina Pace Pereira Lima (2016) **Antioxidant compounds of organically and conventionally fertilized jambu (*Acmella oleracea*)**, *Biological Agriculture & Horticulture*,32:3,149-158,DOI:[10.1080/01448765.2015.1103304](https://doi.org/10.1080/01448765.2015.1103304)

BrCAST 2019. Tabela de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. **BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCETIBILITY TESTING**, s.l. 70p.

Dubey, Suchita; Maity, Siddhartha; Singh, Mahendra; Shubhini A. Saraf; Saha .Sudipta. **"Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review"**, *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, vol. 2013, Article ID 423750, 9 pages, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/423750>

FRANCA, J.V. et al. Métodos distintos de crescimento e extração de *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen aumentando diferentes concentrações de espilantol: um importante composto bioativo na dieta humana. **SCIENCE DIRECT**. Elsevier, v.89, p.781-789, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.018>.

FREITAS-BLANCO, V.S. et al. Spilanthol, a principal alquilamida de *Acmella oleracea*, atenua a mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos. **PLANTA MED** v.85, n.3, p.203-209, 2019. <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/a-0715-2002>

Huang W-C, Huang C-H, Hu S, Peng H-L, Wu S-J. **Topical Spilanthol Inhibits MAPK Signaling and Ameliorates Allergic Inflammation in DNCB-Induced Atopic Dermatitis in Mice**. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(10):2490. <https://doi.org/10.3390/ijms20102490>

Mello, F.B. e Mello, J.R.B. **Eficácia antitussígena de duas formulações fitoterápicas**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]*. 2007, v. 59, n. 3 [Acessado 5 Setembro 2021] , pp. 705-710. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000300024>>. Epub 19 Set 2007. ISSN 1678-4162. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000300024>.

Meneses, J.O. et al. **Efficacy of *Ocimum gratissimum* essential oil against the monogenean *Cichlidogyrus tilapiae* gill parasite of Nile tilapia**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]*. 2018, v. 70, n. 02 [Accessed 5 September 2021], pp. 497-504. Available from: <<https://doi.org/10.1590/1678-4162-9667>>. ISSN 1678-4162. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9667>.

Molina-Torres J, García-Chávez A, Ramírez-Chávez E. **Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin.** J Ethnopharmacol. 1999 Mar;64(3):241-8. doi: 10.1016/s0378-8741(98)00134-2. PMID: 10363839.

NEVES, D.A. **Caracterização química, determinação da presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, e avaliação do efeito do cozimento na composição química, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana do jambu (*Acmella oleracea*(L.) R.K. Jansen) –** Campinas, SP: [s.n.], 2018. http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/333735/1/Neves_DanielaAndrade_D.pdf.

Nobuji Nakatani, Mayumi Nagashima, **Pungent Alkamides from *Spilanthes acmella* [L. var. *Oleracea* Clarke, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 56, Issue 5, 1 January 1992, Pages 759–762,** <https://doi.org/10.1271/bbb.56.759>

Pires, I.F.B. et al. **Plantas medicinais como opção terapêutica em comunidade de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais [online]. 2014, v. 16, n. 2 suppl 1 [Acessado 5 Setembro 2021] , pp. 426-433. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_089>. Epub 14 Ago 2014. ISSN 1983-084X. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_089.

Porsani, M.Y.H. et al. **The use of papain gel cream and sunflower oil in promoting healing in a wound in dogs: three case reports.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]. 2016, v. 68, n. 05 [Accessed 5 September 2021] , pp. 1201-1206. Available from: <<https://doi.org/10.1590/1678-4162-8561>>. ISSN 1678-4162. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8561>.

RANI, S.A.E; MURTY, S.U. Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes Acmella* Linn. **REVISTA FITOS**, v.9, n.1, p.67-68, 2006. <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/103>.

Sprenger, L.K. et al. **Atividade ovicida e larvicida do extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* sobre parasitas gastrintestinais de bovinos.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]. 2015, v. 67, n. 1 [Acessado 5 Setembro 2021] , pp. 25-31. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-7134>>. ISSN 1678-4162. <https://doi.org/10.1590/1678-7134>.

Trevisan, L.F.A. et al. **Tratamento alternativo em gatos acometidos por DITUIF. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]**. 2016, v. 68, n. 04 [Acessado 5 Setembro 2021], pp. 1099-1103. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-4162-8924>>. ISSN 1678-4162. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8924>.

Yamane, Lais Thiemi. Et al, "***Acmella oleracea* and *Achyrocline satureioides* as Sources of Natural Products in Topical Wound Care**", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2016, Article ID 3606820, 9 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3606820>