

EFEITO DO *Schinus terebinthifolius* NA INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO BACTERIANO E QUEBRA DE BIOFILME *IN VITRO*: RESULTADOS PRELIMINARES

(Effect of Schinus terebinthifolius inhibiting bacterial growth and biofilm breakdown in vitro: Preliminary Results)

José Adelson Alves do NASCIMENTO JÚNIOR¹, Lúcia Cristina Pereira ARRUDA^{2*}, Avaniel Marinho da SILVA³; Maria Tereza dos Santos CORREIA¹; Luiza Campelo CARNEIRO⁴, Laís Querino Barboza FREIRE⁵, Gustavo Ferrer CARNEIRO²

¹Dpto de Bioquímica da UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, CEP: 52.171-900, Recife/PE, Brasil;

²Laboratório de Andrologia, Dpto de Medicina Veterinária (UFRPE); ³HEBRON Farmacêutica,

Caruaru/PE; ⁴Universidade Católica de Pernambuco/PE; ⁵Universidade Federal do

Agreste de Pernambuco/PE. *E-mail: luciacpa@hotmail.com

ABSTRACT

Endometritis is considered as one of the main causes of subfertility and infertility in mares, having a great economic impact on equine industry. Chronic uterine infections resistant to antimicrobial agents can be caused due to the production of biofilm. Phytoterapy products provide a great potential for the production of new drugs due to their structural diversity. *Schinus terebinthifolius*, is a plant with antiseptic and anti-inflammatory. In clinical studies, its therapeutic action has been proven in cervicitis and chronic cervical-vaginitis in women. Thus, the objective of this work was to evaluate *in vitro* the growth in clinical bacterial isolates, production of biofilm and its breakdown against different concentrations of a medication based on *Schinus terebinthifolius* (Kronel®). As a result, a numeric reduction in bacterial growth was observed, as well as a partial break in the biofilm directly proportional to the concentration of *Schinus terebinthifolius* used. Different activities were also found according to bacteria tested. Despite being preliminary data, it was possible to observe a positive action both in the inhibition of growth and in the partial breakdown of a natural commercial product obtained from *Schinus terebinthifolius* in the bacterial treatment *in vitro*.

Key Words: Endometritis, equine, aroeira, phytoterapy.

INTRODUÇÃO

Em éguas, infecções uterinas crônicas resistentes a agentes antimicrobianos podem ser causadas devido à produção de biofilme. Estudos comprovam que mais de 80% das bactérias isoladas de útero equino são capazes de formar biofilme *in vitro* (VARGAS *et al.*, 2019). Nesse contexto, há uma grande necessidade na busca de novas terapias para controle de infecções cujos microrganismos utilizam a formação de biofilme como estratégia protetora (FERRIS *et al.*, 2016).

Produtos derivados de plantas medicinais fornecem grande potencial para produção de novos fármacos devido à sua diversidade estrutural, com evidências na literatura sobre sua eficácia na ação antimicrobiana no biofilme (NASCIMENTO JÚNIOR *et al.*, 2019). A *Schinus terebinthifolius* é uma árvore de pequeno a médio porte, pertencente à família Anacardiaceae, com propriedades adstringente, antisséptica e anti-inflamatória na medicina popular e uso em preparações cosméticas (BIAVATTI *et al.*, 2007; AGRA *et al.*, 2008). O seu extrato contém taninos, terpenos e flavonóides, destes componentes, as propriedades

potenciais e antioxidantes foram atribuídas aos flavonóides (CARVALHO *et al.*, 2003). Em estudos clínicos, ficou comprovado a ação terapêutica em cervicites e cérvico-vaginites crônicas, utilizando tampões intravaginais, em contato com a cérvix durante 24 horas (LIMA *et al.*, 2006).

Os objetivos deste estudo foram: avaliar o crescimento em isolados bacterianos clínicos e a produção de biofilme na presença de diferentes concentrações de uma medicação a base de *Schinus terebinthifolius in vitro* (Kronel[®]), para testar a hipótese de inibição ou quebra do biofilme na presença de diferentes concentrações deste produto fitoterápico.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento e colheita das amostras

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais (CEUA) da UFRPE de acordo com a licença 095/2019. Foram utilizados isolados clínicos obtidos de éguas com histórico de subfertilidade, provenientes de propriedades localizadas na Região Agreste do estado de Pernambuco, durante a estação de monta de 2019. Após avaliação ginecológica, foram coletadas amostras com o auxílio de coletores comerciais do tipo escova citológica duplamente guardados (PROVAR[®]). Depois de colhida a amostra, foi realizado esfregaço em lâmina estéril para citologia e posteriormente um *swab* estéril para obtenção de uma alíquota da amostra para cultura. As amostras foram armazenadas em tubos contendo meio BHI Caldo (Brain Heart Infusion), acondicionadas em caixa de transporte de isopor, sob refrigeração, e encaminhadas para a UFPE para as análises de cultivo e identificação bacteriana, formação de biofilme, ação do Kronel[®] sobre crescimento e quebra de biofilme bacteriano.

Identificação bacteriana

As amostras em caldo BHI foram incubadas em estufa sobre aerobiose a ± 37 °C por 24 horas. Após as 24 horas de incubação, foram semeadas em placas contendo Agar Sangue de Carneiro 6% (v/v) e Agar McConkey e posteriormente incubadas. Após incubação foram avaliadas pelo método de coloração Gram de acordo com Quinn (1994).

Bactérias isoladas

Foram coletadas amostras de *Escherichia coli* (EC); *Klebsiella pneumoniae* (KP); *Proteus Mirabilis* (PM); *Staphylococcus aureus* (SA); *Acinetobacter baumannii* (AB); *Salmonella Spp.* (SS) e *Micrococcus spp* (Mi).

Quantificação da formação de biofilme

Para quantificação da formação de biofilme bacteriano, foi utilizada a técnica do Cristal Violeta, descrito por Darwish e Asfour (2013). Com as placas lidas em espectrofotômetro a 570nm. E a interpretação estabelecendo o ponto de corte a partir da média aritmética e desvio padrão das densidades óticas (ODs) do controle negativo (ODc), a média aritmética das ODs das amostras testes (ODt) foi utilizada para classificar a amostra de

acordo com as seguintes categorias: Não produtora de biofilme = $OD \leq 0,071$; Fraca produtora = $0,071 < OD \leq 0,141$; Produtora moderada = $0,141 < OD \leq 0,282$; e Forte produtora de biofilme = $OD > 0,282$.

Ação do Kronel® na quebra de biofilme bacteriano

As bactérias previamente avaliadas como capazes de produzir biofilme, foram induzidas a produzir biofilme e após as 24 horas de incubação o conteúdo foi removido e foram adicionadas em cada poço, diferentes concentrações do Kronel® (4mg/mL, 3mg/mL, 2mg/mL, 1mg/mL, 0,8mg/mL, 0,6mg/mL, 0,4mg/mL, 0,2mg/mL, 0,1mg/mL, 0,05mg/mL). Posteriormente, as placas foram incubadas por mais 24h a 37 °C sob agitação e após esse período, os poços foram corados com cristal violeta a 0,5% e depois de secas, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 570nm, comparando com os resultados anteriores. Os resultados obtidos foram analisados através da análise descritiva, utilizando o software Microsoft Excel 2010, onde foram estabelecidas as frequências absolutas e relativas dos dados encontrados.

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados através da análise descritiva, utilizando o software Microsoft Excel 2010, onde foram estabelecidas as frequências absolutas e relativas dos dados encontrados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) do Kronel® estabelecido em 4mg/mL e 0,04mg/mL. A *Escherichia coli* (EC) foi utilizada como teste padrão em todas as concentrações avaliadas, enquanto as demais bactérias foram desafiadas no MIC e MBC.

De acordo com os dados demonstrados na Fig. 01, foi observada redução numérica do crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas na presença da EC, assim como na avaliação do MIC e MBC das demais bactérias houve redução de crescimento bacteriano quando comparado a concentração de 4mg/mL a 0,4mg/mL.

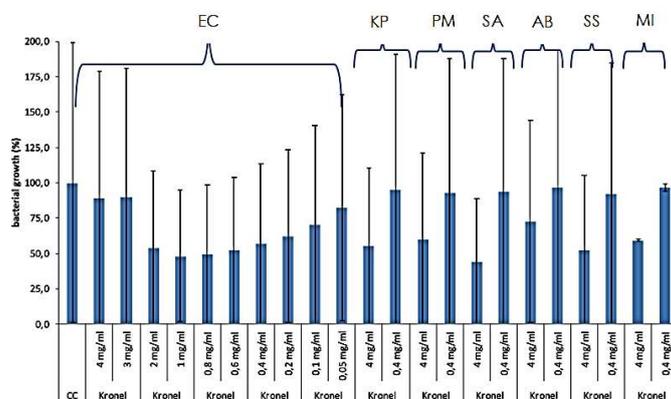


Figura 01: Gráfico demonstrando crescimento bacteriano em diferentes concentrações do Kronel®.

EC: *Escherichia coli*; KP: *Klebsiella Pneumoniae*; PM: *Proteus Mirabilis*; SA: *Staphylococcus Aureus*; AB: *Acinetobacter Baumanni*; SS: *Salmonella spp.*; MI: *Micrococcus spp.*

Na Fig. 02, observa-se a quebra parcial do biofilme em todas as concentrações do Kronel®.

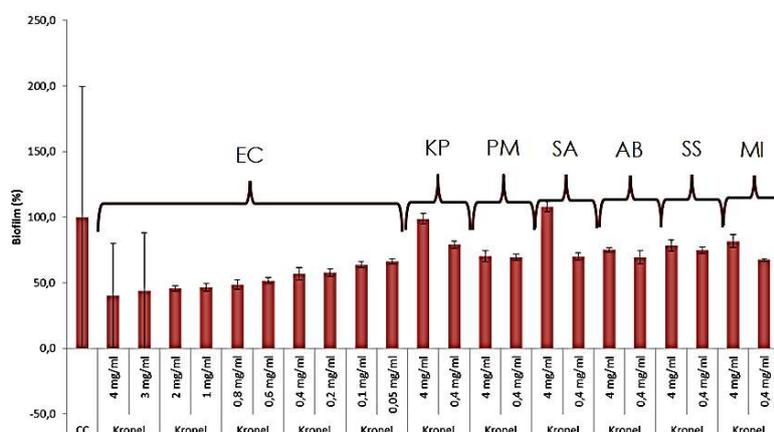


Figura 02: Gráfico demonstrando a quebra de biofilme em diferentes concentrações do Kronel®.

EC: *Escherichia coli*; KP: *Klebsiella Pneumoniae*; PM: *Proteus Mirabilis*; SA: *Staphylococcus Aureus*; AB: *Acinetobacter Baumannii*; SS: *Salmonella spp.*; MI: *Micrococcus spp.*

Há ações tanto de inibição bacteriana, como de quebra parcial do biofilme, de acordo com a cepa da bactéria testada. Apesar de se tratar de dados preliminares, foi possível observar a capacidade inibidora do *Schinus terebinthifolius* no crescimento bacteriano, assim como a capacidade da quebra de biofilme. A identificação precisa da bactéria e de sua capacidade de produção de biofilme é um fator de fundamental importância já que observamos diferentes comportamentos de acordo com a bactéria testada. Mais pesquisas serão necessárias para entendermos primeiramente o mecanismo de formação e quebra de biofilme e principalmente a ação específica do *Schinus terebinthifolius* (Kronel®).

CONCLUSÕES

Apesar de se tratar de dados preliminares, foi possível observar a capacidade inibidora do *Schinus terebinthifolius* no crescimento bacteriano, assim como a capacidade da quebra de biofilme.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognóssia*, v.18, p.472-508, 2008.
- BIAVATTI, M.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Farmacognóssia*, v.17, p.640-653, 2007.

CARVALHO, M.C.; BARCA, F.N.; AGNEZ-LIMA, L.F.; MEDEIROS, S.R. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Shinus terebinthifolius* Raddi). *Environmental Molecular Mutagen*, v.42, p.185-191, 2003.

DARWISH, S.F.; ASFOUR, H.A.E. Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal*, v.2013, p.1-9, 2013.

FERRIS, R.A.; HENNET, M.R.; BORLEE, B.R.; BORLEE, G.I.; MCCUE, P.M. Detection of Bacterial Biofilm and Evaluation of the Host Immune Response Using an Experimental Model of Bacterial Endometritis. In: *Proceeding of the AAEP 62nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Orlando, Florida, 2016.

LIMA, M.R.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.; SANT'ANA, A.E.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.105, p.137-147, 2006.

NASCIMENTO JÚNIOR, J.A.A.; CORREIA, M.T.S.; MACIEL, N.G.P.; CARNEIRO, G.F. Derivados de produtos naturais são capazes de romper biofilme in vitro de bactérias isoladas de útero de éguas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 43, n.2, p.571, 2019.

QUINN, P.J. *Clinical Veterinary Microbiology*, London: Wolfe, 1994. p.648.

VARGAS, H.; NASCIMENTO JÚNIOR, J.A.A.; SOBRAL, G.G.; VIANA, A.R.; VILAR, I.J.; CARNEIRO, G.F. Intrauterine infusion of Ozone in susceptible mare. *Animal Reproduction*, v.16, n.1, p.103, 2019.