

EFEITO DO EXTRATO DE *Acmella oleracea* EM BIOFILMES DE *Pseudomonas aeruginosa*

Daiany Gomes do Nascimento, Isabelle Ferreira, Cristina Pacheco Soares.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, daianyunivap@gmail.com, iferreira.vet@gmail.com, cpacheco.cps@gmail.com

Resumo

Este estudo experimental avaliou a atividade antibacteriana do extrato alcoólico de *Acmella oleracea* - planta nativa do Brasil - sobre biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, agente relevante na medicina veterinária, utilizando cepa isolada de cão, cepa padrão (ATCC) e resistente. Os biofilmes foram cultivados em placas de 96 poços e, após sua formação, foram tratados por 24 horas com o extrato e com antibiótico para comparação de eficácia. Em seguida, avaliou-se a atividade metabólica das bactérias e as alterações estruturais dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados indicaram atividade antibacteriana relevante contra as cepas isoladas e padrão, evidenciada pela redução da viabilidade bacteriana. Em contrapartida, tanto o extrato quanto o antibiótico apresentaram baixa eficácia frente à cepa resistente. As análises por MEV confirmaram alterações estruturais nos biofilmes sensíveis, enquanto a cepa resistente manteve sua organização morfológica preservada. Conclui-se que novas abordagens, incluindo diferentes métodos de extração e avaliação de sinergismo com antibióticos, podem explorar o potencial terapêutico da planta.

Palavras-chave: Antibacteriano. Bactérias. Plantas Medicinais.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde / Biomedicina.

Introdução

A pele, maior órgão do corpo, funciona como uma barreira essencial que protege o organismo contra agressões do ambiente externo (Trompette e Ubags, 2023). Quando essa proteção é comprometida, pode surgir a piodermite canina, uma infecção bacteriana que atinge a pele de forma superficial ou profunda (Loeffler *et al.*, 2025). Entre os agentes causadores, destaca-se *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria Gram-negativa oportunista relevante na medicina veterinária, devido à sua alta adaptabilidade e capacidade de colonizar diversos tecidos, apresentando maior riscos de infecção em animais imunossuprimidos (Souza *et al.* 2023).

A formação de biofilmes por *P. aeruginosa* favorece a persistência da infecção, tornando o tratamento mais difícil e menos eficaz (Tuon *et al.*, 2022). Esse problema é agravado pelo aumento da resistência a antibióticos, com cepas multirresistentes que comprometem as terapias disponíveis e elevam o risco de disseminação para o ambiente e para a população humana (Mariotini e Carvalho, 2020).

Nesse cenário, alternativas terapêuticas à base de compostos naturais têm sido investigadas. *Acmella oleracea* (jambu), planta da família Asteraceae nativa do Brasil e amplamente usada na medicina tradicional e culinária regional, possui folhas e flores com compostos bioativos, associados a estudos que investigam suas ações anti-inflamatórias, analgésicas e antimicrobianas. Entre elas, as N-alquilamidas se destacam, com o espilantol como principal composto ativo (Ferreira *et al.*, 2021; Rahin *et al.*, 2021).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *Acmella oleracea* sobre biofilmes de três cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: ATCC 15442, resistente e isolada de lesão cutânea animal.

Metodologia

Este estudo foi previamente submetido à apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) e aprovado sob o número de protocolo A10/CEUA2024. A pesquisa foi conduzida mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo responsável legal do animal, bem como a emissão da carta de Anuência pela clínica parceira, autorizando formalmente a coleta dos materiais em suas instalações pelos médicos veterinários responsáveis.

A coleta da amostra foi realizada a partir de um único animal, utilizando *swabs* com meio de transporte Stuart. Em seguida, o material foi semeado em placas de Petri contendo meio BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubado em estufa microbiológica a 37°C por 24 horas. Após esse período, foi realizada a coloração de Gram, e as colônias desenvolvidas no BHI foram repicadas em meio seletivo para bactérias Gram-negativas (MacConkey), sendo novamente incubadas sob as mesmas condições por mais 24 horas. Após o crescimento, foi realizado o teste bioquímico em meio Rugai. Para identificação da bactéria presente na lesão.

Após a identificação da bactéria *P. aeruginosa*, foram obtidas as cepas padrão ATCC fornecidas pelo Centro Diagnóstico Laboratorial da Universidade do Vale do Paraíba, e a cepa resistente que foi cedida pelo Laboratório Fotobios do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. Todas as cepas foram posteriormente mantidas em caldo BHI; após o crescimento em estufa, foram armazenadas sob refrigeração.

O extrato alcoólico de *Acmella oleracea* (jambu) utilizado no experimento foi obtido a partir de plantas cultivadas no Centro de Estudos da Natureza (CEN) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). O processo líquido-líquido foi realizado no Laboratório de Síntese Orgânica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (Silva *et al.*, 2021, p.3). Para a preparação do extrato alcoólico de *Acmella oleracea*, foi ressuspenso 5 mg/mL de etanol absoluto, sendo a solução estoque. A partir desta, coletou-se 1,680 µL, adicionados em 6.720 µL em caldo BHI, resultando em uma concentração final de 1mg/mL, estando a concentração final de etanol 12,5%.

Para a formação do biofilme com as três cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC, Resistente e Isolada clínica), foi adotada a metodologia proposta por Azevedo (2024). Primeiramente, realizou-se o repique de 100 µL da bactéria em 10 mL de caldo BHI, acondicionado em tubos de 15 mL e incubado em estufa microbiológica a 37°C por 24 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspenso em 3 mL de PBS com auxílio de vórtex. Esse processo foi repetido nas mesmas condições e ao final a suspensão foi ajustada em 3 mL de caldo BHI para leitura no espectrofotômetro (570 nm) na densidade óptica 0,05, visando a padronização da concentração bacteriana em 10⁵, com base em metodologia adotada no laboratório de Biologia Celular e Tecidual, no IP&D, UNIVAP. Quando necessário, para a obtenção da densidade óptica prevista, foram adicionados até 3 mL para ajuste final. Posteriormente, 100 µL da suspensão bacteriana e 100 µL de caldo BHI foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços, seguidos de incubação a 37°C por 24 horas para permitir o desenvolvimento da estrutura aderente. A leitura foi realizada em todos os procedimentos de utilização das amostras bacterianas (n~10).

Nos ensaios destinados à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a formação do biofilme seguiu o mesmo protocolo descrito anteriormente, com a inserção de uma lamínula no fundo de cada poço da placa de 96 poços antes da adição de 100 µL da suspensão bacteriana e 100 µL de caldo BHI, também incubados por 24 horas a 37°C.

Após a incubação, os biofilmes foram submetidos aos respectivos tratamentos: grupo controle (sem intervenção), grupo tratado com 100 µL do extrato de *Acmella oleracea* (jambu) e grupo tratado com 50 µL da solução antibiótica contendo 10.000 UI/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina. Em seguida, as placas foram novamente incubadas por 24 horas a 37°C.

Concluído o período de tratamento, a atividade metabólica dos biofilmes foi avaliada utilizando o corante resazuriana na concentração final de 440 µM. Para isso, o meio foi removido, os poços que continham o tratamento com jambu foram lavados com 100 µL de PBS e, em seguida, adicionados 100 µL da solução de resazurina. A placa foi incubada por 1 hora e o metabolismo bacteriano foi quantificado por leitura em espectrofotômetro 570 nm (Longhin *et al.*, 2022).

Para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), o biofilme foi formado em filme de Aclar (Aclar Embedding Film- Eletron Microscopy Science). Após o tratamento, os poços foram lavados com 100 µL de PBS e fixados com 200 µL de paraformaldeído por 10 minutos. Em seguida, procedeu-se à

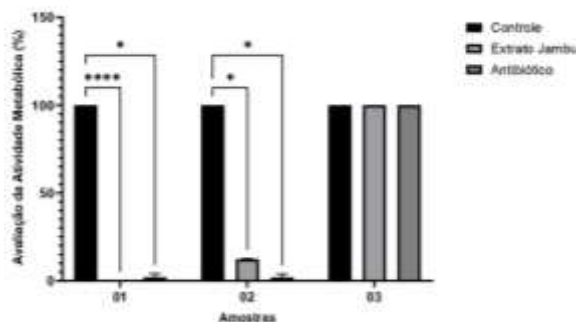
desidratação com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 90% e 100%), incubando-se 10 minutos em cada. Por fim, foi adicionada uma solução de 100 μ L de HMDS (hexametildisilazano) e 100 μ L de etanol absoluto, finalizando o preparo para análise em MEV.

Resultados

O crescimento inicial em meio Brain Heart Infusion (BHI), um meio não seletivo, resultou na formação de colônias que, após a coloração de Gram, indicou bacilos Gram-negativos, evidenciados pela coloração rosada. No meio MacConkey, observaram-se colônias incolores, redondas e planas, indicando ausência de fermentação de lactose - perfil característico de *Pseudomonas aeruginosa*. No meio Rugai, verificou-se ausência de fermentação de açúcares, ausência de produção de gás e crescimento restrito à superfície, condizente com a natureza aeróbia estrita da espécie. Esses achados são compatíveis com a identificação de *P. aeruginosa*.

A análise da atividade metabólica do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* após o tratamento com *Acmella oleracea* resultou em uma redução significativa da viabilidade celular, equivalente à observada com o uso do antibiótico. Conforme ilustrado no gráfico (Figura 1), a amostra 1 corresponde à cepa clinicamente isolada, a amostra 2 à cepa padrão ATCC e a amostra 3 à cepa resistente. Observa-se, nas amostras 1 e 2, tanto o extrato da planta quanto o antibiótico, aplicados separadamente, apresentaram efeito na redução da atividade metabólica do biofilme. Em contraste, nas amostras 3, não foi observada inibição em relação ao controle, com atividade metabólica viável mesmo após o tratamento, sugerindo a resistência da cepa à ação de ambos.

Figura 1 - Atividade metabólica (resazurina) no biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* após tratamento com *Acmella oleracea* e antibiótico. * $p = 0,01$ grupo controle comparado ao tratamento com antibiótico ; **** $p < 0,0001$ grupo controle comparado com extrato de jambu, na amostra 1. Análise por Two-way ANOVA/Tukey.

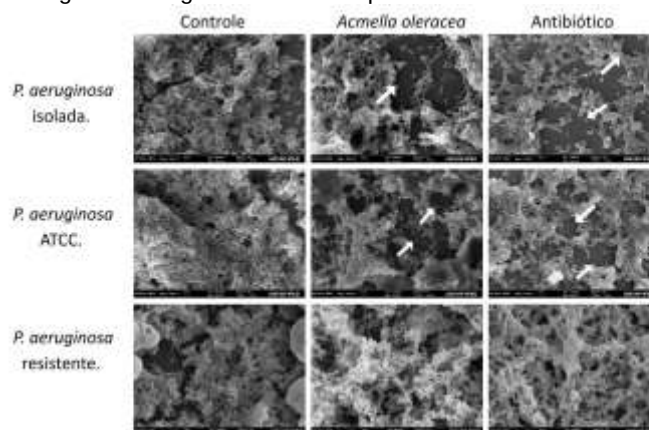


Fonte: Os autores, 2025.

A figura 2 apresenta fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), organizadas conforme as diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (isolada de animal, ATCC e resistente) e condições experimentais (controle, tratamento com *Acmella oleracea* e tratamento com antibiótico).

A análise morfológica evidenciou alterações estruturais no biofilme de *P. aeruginosa* após o tratamento com *Acmella oleracea*, especialmente nas cepas isolada e ATCC, nas quais foram observadas desorganização da estrutura e redução da densidade celular, caracterizadas pela presença de espaços sem biofilme. Em contraste, nas imagens do grupo controle dessas mesmas cepas, o biofilme manteve-se denso e bem estruturado. Enquanto, na cepa resistente a estrutura do biofilme permaneceu preservada após ambos os tratamentos, sugerindo maior resistência morfológica frente às intervenções testadas.

Figura 2: Imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV).



Fonte: Os autores, 2025.

Discussão

Os extratos de *Acmella oleracea* demonstraram atividade antimicrobiana significativa frente às cepas sensíveis de *Pseudomonas aeruginosa* testadas, tanto a clínica isolada quanto a cepa de referência (ATCC). Essa ação foi evidenciada pela redução da atividade do e pelas imagens de MEV. No entanto, tanto o extrato quanto o antibiótico utilizados mostram-se ineficazes à cepa resistente, evidenciando o mecanismo de resistência bacteriana.

A literatura descreve estudos que avaliam a atividade antimicrobiana de *Acmella oleracea* atribuída principalmente ao espilantol, sua alquilamida majoritária, com propriedade antimicrobiana e inseticida. Esse composto bioativo está presente nas folhas e flores da planta e também em outras espécies do gênero *Spilanthes*, sendo considerado um ácido graxo com alto potencial terapêutico (Aktar *et al.* 2024).

Afzar *et al.* (2022), relataram MIC (concentração mínima inibitória) de $0,83 \pm 0,21$ a $1,66 \pm 0,41$ $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ para um emulgel metanólico à base do extrato de *Acmella oleracea*, que apresentou atividade antibacteriana contra cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Esses achados estão em consonância com resultados de Fajardo *et al.* (2024), que também utilizaram a cepa ATCC de *P. aeruginosa*. Neste estudo, o extrato reduziu significativamente a adesão do biofilme em $95,50 \pm 6,37\%$ e o crescimento bacteriano em $62,36 \pm 1,01\%$.

Importante ressaltar que, embora existam estudos anteriores sobre o extrato de *Acmella oleracea*, não foram encontrados trabalhos que avaliam sua eficácia frente a cepas resistentes, aspecto abordado no presente estudo.

A atividade antibacteriana de plantas pode variar em função do método de extração empregado, que influencia a composição dos compostos bioativos. Diferentes solventes podem favorecer a obtenção de determinadas substâncias bioativas, alterando a eficácia antimicrobiana. Por exemplo, Alam e Akash (2023) avaliaram o extrato metanólico das folhas de *Acmella oleracea* e observaram atividade antimicrobiana frente a cepas ATCC *Vibrio mimicus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, com zona de inibição de 10 a 26 mm, aumentando conforme a concentração (100-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

De forma semelhante, Alcantara *et al.* (2015) destacaram a atividade do extrato etanólico das flores de *A. oleracea* e suas frações, sendo que a fração de clorofórmio a mais ativa, com MIC de 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra cepas de ATCC *Salmonella typhi*. Esse resultado sugere que a escolha do solvente pode destacar determinados compostos, como o espilantol.

Complementarmente, Royani *et al.* (2024) investigaram o efeito da polaridade de diferentes solventes (hexano, acetato de etila, diclorometano, etanol, metanol e mistura etanol-água) podem influenciar a eficácia do extrato *Andrographis paniculata*, sendo que acetato de etila apresentou melhor desempenho contra a cepa ATCC *P. aeruginosa* (MIC de 312,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Esses achados reforçam que o solvente utilizado pode influenciar diretamente a atividade antimicrobiana, sendo necessários mais estudos para esclarecer como a interação entre solvente e metabólitos vegetais potencializa essa ação.

Por fim, como perspectivas futuras, destaca-se a investigação dos mecanismos de ação do extrato de jambu, com o objetivo de compreender a atuação de seus compostos bioativos, bem como avaliar sua atividade em combinação com antibióticos convencionais. Essa abordagem visa identificar possíveis efeitos sinérgicos capazes de potencializar a eficácia terapêutica, especialmente contra cepas resistentes.

Conclusão

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de *Acmella oleracea* foi alcançado, pois a planta demonstrou eficácia frente às cepas clinicamente isoladas e à cepa padrão ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*, corroborando dados previamente descritos na literatura acerca do potencial bioativos de seus compostos. A ausência de efeito na cepa resistente evidencia a necessidade de estudos adicionais sobre mecanismos de ação, concentração ideal, sinergismos com antibióticos e a influência do solvente na atividade antimicrobiana de metabólitos bioativos da planta, como o espilantol.

Referências

AFZAL, Aqsa et al. Preparation of *Spilanthes acmella*-based emulgel: Antimicrobial study and evaluation. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 287-295, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35228190/>. Acesso em: 28 set. 2025.

AKTAR, Asma et al. Pharmacological and phytochemical review of *Acmella oleracea*: a comprehensive analysis of its therapeutic potential. **Discover Applied Sciences**, [s. l.], v. 6, 412, 30 jul. 2024. DOI <https://doi.org/10.1007/s42452-024-06108-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42452-024-06108-5#citeas>. Acesso em: 27 jul. 2025.

ALAM, Mahbubol; AKASH, Sajidur Rahman. *In vitro* pharmacological activities of methanol extract of *Acmella oleracea* leaves: A variety grown in Dhaka, Bangladesh. **Indian Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 42-49, 16 abr. 2023. DOI <https://doi.org/10.18231/j.ijmr.2023.008>. Disponível em: <https://www.ijmronline.org/article-details/18800>. Acesso em: 28 set. 2025.

ALCANTARA, Bianca Nascimento et al. Pharmacognostic analyses and evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen (Jambu) floral extract and fractions. **Journal of Medicinal Plants Research**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 91-96, 25 jan. 2015. DOI <https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5680>. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-abstract/8D4B77050371>. Acesso em: 28 set. 2025.

AZEVEDO, Maria Clara Barbosa Silva. Comparativo do efeito antibacteriano da tetraciclina em cultura planctônica e biofilme de *Staphylococcus aureus* resistente. **III Simpósio de engenharia biomédica do Vale do Paraíba - Caracterização e diagnósticos óptico e molecular**, São José dos Campos. [...]. [S. l.], s. n., 2024. Disponível em: <https://congressos.univap.br/soac/index.php/IIISEBVaP/IIISEBVaP/paper/viewFile/235/284>. Acesso em: 20 ago. 2025.

FAJARDO, Júlia Bertolini et al. Insights into the bioactive potential of the Amazonian species *Acmella oleracea* leaves extract: A focus on wound healing applications. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 337, n. 2, 30 jan. 2025. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118866>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874124011656?via%3Dihub>. Acesso em: 28 set. 2025.

FERREIRA, Karina Carvalho et al. *Acmella oleracea*, planta medicinal usada como alívio da dor: análise colorimétrica dos metabólitos secundários / *Acmella oleracea*, medicinal plant used as pain relief: colorimetric analysis of secondary metabolites. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 7, ed. 10, 29 out. 2021. DOI <https://doi.org/10.34117/bjdv7n10-435>. Disponível em:

<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/38755#:~:text=Spilanthes%20oleracea%2C%20S.,nos%20%C3%A1bios%20e%20na%20%C3%ADngua>. Acesso em: 26 jul. 2025.

LOEFFLER, Anette et al. Antimicrobial use guidelines for canine pyoderma by the International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID). **Veterinary Dermatology**, [s. l.], v. 36, ed. 3, p. 234-282, 7 maio 2025. DOI <https://doi.org/10.1111/vde.13342>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vde.13342>. Acesso em: 26 jul. 2025.

LONGHIN, Eleonora Marta et al. The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. **Front. Toxicol**, [s. l.], v. 4, n. 981701, 28 set. 2022. DOI 10.3389/ftox.2022.981701. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36245792/>. Acesso em: 28 set. 2025.

MARIOTINI, Anna Barbara; CARVALHO, Elisabeth Valente. Perfil de resistência aos antibióticos de bactérias isoladas de infecções de animais atendidos no UNIFFA. **Revista Saber Digital**, [s. l.], v. 13, ed. 1, p. 176-187, 2 out. 2020. Disponível em: <https://revistas.faa.edu.br/SaberDigital/article/view/870>. Acesso em: 26 jul. 2025.

RAHIM, Rohanizah Abdul et al. Potential Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Spilanthes acmella* and Its Health Beneficial Effects: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 18, n. 3532, ed. 7, 29 mar. 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/ijerph18073532>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33805420/>. Acesso em: 26 jul. 2025.

ROYANI, Ahmad et al. Effect of solvent polarity on yield extract, antioxidant and antibacterial activities of phytochemicals from *Andrographis paniculata* leaves. **Indian Chemical Engineer**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 1-15, 14 out. 2024. DOI <https://doi.org/10.1080/00194506.2024.2409260>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00194506.2024.2409260>. Acesso em: 28 set. 2025.

SILVA, L. et al. Action of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen leaves extract in co-cultivation of *Staphylococcus aureus* AND L929 (fibroblasts) simulating infectious cellulite process. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 16, 18 dez. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i16.24178>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/357159933_Acao_de_extrato_de_folhas_de_Acmella_oleracea_L_R_K_Jansen_em_co-cultivo_de_Staphylococcus_aureus_e_L929_fibroblastos_simulando_processo_de_celulite_infecciosa. Acesso em: 27 jul. 2025.

SOUSA, Telma et al. The Impact of the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Dogs. **Veterinary Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 343, ed. 5, 11 maio 2023. DOI <https://doi.org/10.3390/vetsci10050343>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-7381/10/5/343>. Acesso em: 26 jul. 2025.

TROMPETTE, Aurélien; UBAGS, Niki D. Skin barrier immunology from early life to adulthood. **Mucosal Immunology**, [s. l.], v. 16, ed. 2, p. 194-207, 2 mar. 2023. DOI <https://doi.org/10.1016/j.mucimm.2023.02.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1933021923000132>. Acesso em: 26 jul. 2025.

TUON, Felipe Francisco et al. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. **Pathogens**, [s. l.], v. 11, ed. 3, p. 300, 24 fev. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8950561/>. Acesso em: 26 jul. 2025.