

Instituto de Pesquisas Biológica
"Sinisa Stankovic"
Universidade em Belgrado

Bul. despota Stefana 142
Diretor; 011-2078-399
Tel: 011-2078-300
Fax: 011- 2078-433
www.ibiss.bg.ac.rs
No. 01-318



INSTITUTE FOR BIOLOGICAL
RESEARCH
"SINIŠA STANKOVI " "
University of Belgrade

Bul. despota Stefana 142
Director: 011-2078-399
l: 011-2078-300
Fax: 011- 2078-433
www.ibiss.bg.ac.rs
Data: 13.02.2017.

**RELATÓRIO SOBRE A PESQUISA DAS ACTIVIDADES ANTI-BACTERIAIS E ANTI-FÚNGICAS
DA PREPARAÇÃO "Herba Sept"**

"Baltik Junior"
Vucicev prolaz, 20a
Belgrado

Belgrado, 08.02.2017

Assunto: Resposta referente à carta de 09.12.2016.

A empresa "**Baltik Junior**" contactou o Instituto de Pesquisa Biológica "Sinisa Stankovic" de Belgrado (doravante IBISS) buscando uma opinião de especialistas sobre a ação anti-bacteriana e anti-fúngica potencial do produto "Herba Sept ",
Com base na revisão da documentação apresentada pelo requerente e depois da revisão da literatura e certas análises laboratoriais, chegamos a seguinte:

OPINIÃO TÉCNICA

A amostra "Herba Sept" foi investigada em relação às bactérias Gram (+) e Gram (-): A pesquisa utilizou as seguintes espécies bacteriais: *Streptococcus pyogenes* (IBRS S003), *Streptococcus mutans* (IBRS S001), *Lactobacillus acidophilus* (IBRS L001), *Streptococcus salivarius* (IBRS S006), *Streptococcus sanguis* (IBRS S002), *Pseudomonas aeruginosa* (IBRS P001), *Proteus mirabilis* (clinical isolate), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus aureus* (MRSA) 11, um resistente à meticilina. Para os estudos de actividade antifúngica *in vitro* a *Candida albicans* (IBRS MH4) e *C.krusei* (IBRS 1flac1) foram usadas. Todos os microrganismos foram depositados na Micoteca do laboratório micológico do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Pesquisa Biológica "Sinisa Stankovic" da Universidade de Belgrado. Os isolados pesquisados foram tomados da cavidade oral dos pacientes.

Tem sido usado o método da microdiluição *in vitro* (Hane e Raether, 1988, Sokovic et al., 2010). O produto foi testado na sua forma concentrada original, bem como em 4 graus de diluição:

- Ir - A materia concentrada "Herba Sept";
- Iir - A diluição "Herba Sept" (1 ml de concentrado + 0,5 ml da solução fisiologica);
- IIIr - A diluição "Herba Sept" (1 ml de concentrado + 1 ml da solução fisiologica);
- IVr - A diluição "Herba Sept" (1 ml de concentrado + 2 ml da solução fisiologica);
- Vr - A diluição "Herba Sept" (1 ml de concentrado + 3 ml da solução fisiologica);

Os antibióticos comerciais: *Ospamox*, *Pancef*, *Sinalcillin*, *Klacid*, *Cefalexina* e *Estreptomicina*, e entre os micoticos a *Nistatina*, foram usados como controlo positivo;

Verificou-se que a preparação "Herba Sept" agiu com uma ação bacteriostática e bactericida, ou seja, inibindo o crescimento, mas também impedindo o crescimento adicional de todas as bactérias Gram (-) e Gram (+) testadas, assim como as espécies do género *Cândida* (*C. albicans* e *C. Krusei*). A preparação tem demonstrado as actividades antibacteriais e antifúngicas em todas as diluições testadas (Tabela 1, Figuras 1 e 2).

Na sua forma concentrada, a preparação funciona com o maior potencial anti-bacterial, a concentração inibitória mínima (MIC) de 0,025 – 0.30 mg/ml e a concentração bactericida (MBC) de 0,10 - 0,40 mg/ ml.

Na diluição II (1 ml da preparação + 0,5 ml de solução fisiológica), a preparação mostrou uma boa actividade anti-bacteriana (MIC 0.05 - 0.60 mg/ml, MBC 0,4 - 0,8 mg/ml). Na diluição III (1 ml do concentrado + 1 ml de solução fisiológica), a preparação também mostrou uma forte actividade anti-bacteriana (MIC 0.15 - 0.40 mg/ml e MBC 0,20-8,0 mg/ml). A preparação diluída em relação 1 ml de concentrado + 2 ml de solução fisiológica, ou seja a diluição IV, exhibe uma actividade inibidora contra todas as bactérias excepto a *S. aureus* (MIC 0.40 - 0,80 mg/ml). A actividade bactericida foi demonstrada com 0,80 mg/ml em seis bactérias, enquanto no *S.aureus*, *S. aureus MRSA*, *S.salivarius*, *S.sanguis* e *P. aeruginosa*, a preparação nesta relação não tem mostrado uma actividade bactericida. Na diluição V (1 ml de concentrado + 3 ml de solução fisiológica), a preparação actuou com um efeito inibidor sobre todas as bactérias (MIC 0:40 - 0,80 mg/ml) excepto sobre *S. aureus MRSA* e *Streptococcus pyogenes*, enquanto a actividade bactericida foi demonstrada em seis bactérias (MBC 0,80 mg/ml). No casos de *S. aureus*, *S. aureus MRSA*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, e *P. aeruginosa* não agiu. As bactérias mais resistentes em relação ao produto testado são *S. aureus* e *S. aureus MRSA*. A bactéria mais sensível aos efeitos da amostra testada é *S.salivarius*. Verificou-se que esta preparação tem efeito em todas as diluições, mesmo às bactérias mais resistentes, Gram (-), incluindo *Pseudomonas aeruginosa* que é uma das bactérias mais resistentes (Sokovic et al, 2010).

Os antibióticos testados mostraram efeito anti-bacteriano forte em relação a todas as bactérias testadas, excepto *Ospamoks* que não mostrou actividade sobre *S. aureus MRSA*, *S. pyogenes* e *S.sanguis*; a *Pancefa* que não teve efeito bactericida sobre *S. aureus*, *S. aureus MRSA* e *P. aeruginosa*; e *Sinalcilin* que não agiu sobre *S.sanguis* em concentrações testadas (0,0005 0,50 mg / ml). (Tabela 1, Figuras 1 e 2).

Na sua forma concentrada, bem como na forma deluída II, a preparação apresentou uma melhor actividade do que os antibióticos, *Sinacilin* e *Ospamoks* em relação as bactérias *S.aureus* e *S.sanguis*.

Em todas as diluições, a amostra testada exhibiu um efeito inibidor (0,15-0,060 mg / ml) e um efeito fungicida (0,40-0,80 mg/ml) em relação aos fungos tratados, *Candida albicans* e *Candida krusei*. A preparação "**Herba Sept**" agiu com a mesma intensidade em ambas as espécies do género *Cândida*

A Nistatina utilizada como o controlo, mostrou uma actividade inibidora de 0,002-0,0007 mg / ml e uma actividade fungicida de 0,003-0,0015 mg / ml. A preparação testada apresentou uma actividade mais fraca do que o fármaco comercial.

Visto que nos últimos anos a incidência de resistência dos microorganismos aos antibioticos sintéticos existentes está aumentando, assim como a toxicidade das preparações comerciais sobre as células humanas, verificou-se uma necessidade de ter novos agentes antimicrobianos semi-sintéticos ou naturais que não têm um efeito prejudicial à saúde das pessoas.

Tomando isso em conta, bem como com base na literatura e ensaios *in vitro* levados a cabo, pode-se chegar a seguinte **CONCLUSÃO**:

O produto testado, a "Herba Sept", demonstra uma boa actividade anti-bacteriana e anti-fúngica. Pode-se concluir que em todas as diluições, a preparação exhibe uma forte actividade antimicrobiana, e que pode ser utilizada em várias diluições (1: 1, 1: 2, 1: 3), sempre mantendo um bom potencial antimicrobiano.

Justifica-se o uso do produto "Herba Sept" na prevenção de varias infeções bacterianas e fúngicas causadas pelas espécies acima-mencionadas. As características deste produto, e o fato que o surgimento da resistência aos produtos naturais é significativamente menor, confirmam esta conclusão.

Referências:

Hänel H. e Raether W. (1988): Um método mais sofisticado de determinar o efeito fungicida das preparações insolúveis em água com um recolhedor de células, utilizando miconazol como um exemplo.' *Mycoses* 31, 148-154.

Sokovic M., J. Glamoclija, Marin DP, Brkic D., van Griensven L.J.I. (2010): Efeitos antibacterianos dos óleos essenciais de ervas medicinais geralmente consumidas usando os modelos *in vitro*, 'Molecules', 15, 7532-7546.

Dr. Marina Sokovic,
(Assinatura)
Pesquisadora,
Laboratório Micologico IBISS

Dr. Pavic Pavlovic
Pesquisador
Diretor de IBISS

(Selo do Instituto de Pesquisas Biológicas - Belgrado);

A pesquisa utilizou as seguintes espécies bacterianas: *Streptococcus pyogenes* (IBRS S003), *mutans Streptococcus* (IBRS S001), *Lactobacillus acidophilus* (IBRS L001), *Streptococcus salivarius* (IBRS S006), *Streptococcus sanguis* (IBRS S002), *Pseudomonas aeruginosa* (IBRS P001), *Proteus mirabilis* (isolado clínico), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e meticillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) 11. Para o estudo da actividade antifúngica *in vitro* foram utilizadas a *Candida albicans* (IBRS MH4) e *C. Krusei* (IBRS 1flac1). Todos os microrganismos foram depositados na *Micoteca* do laboratório micológico, Departamento da fisiologia vegetal, Instituto da Pesquisa Biologica "Sinisa Stankovic", Universidade de Belgrado.

No teste, foram usadas as seguintes diluições da preparação “Herba Sept ”:

- Ir - O concentrado “Herba Sept ”;
- IIr - A diluição “Herba Sept“(1 ml de concentrado + 0,5 ml de solução fisiologica);
- IIIr - A diluição “Herba Sept“ (1 ml de concentrado + 1 ml de solução fisiologica);
- IVr - A diluição “Herba Sept“ (1 ml de concentrado + 2 ml de solução fisiologica);
- Vr - A diluição “Herba Sept ” (1 ml de concentrado + 3 ml de solução fisiologica);

Tabela 1. O efeito anti-microbiano da preparação testada “Herba Sept” (mg/ ml)

		<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> MRSA	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. sanguis</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
Herba sept Ir	MIK	0.20	0.30	0.20	0.30	0.30	0.025	0.075	0.10	0.20	0.15	0.15
	MBK/ MFK	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.10	0.10	0.20	0.40	0.40	0.40
Herba sept IIr	MIK	0.60	0.40	0.30	0.30	0.30	0.05	0.20	0.30	0.60	0.20	0.30
	MBK/ MFK	0.80	0.80	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.80	0.40	0.40
Herba sept IIIr	MIK	0.40	0.30	0.40	0.30	0.40	0.20	0.15	0.40	0.40	0.30	0.30
	MBK/ MFK	0.80	0.40	0.80	0.40	0.80	0.40	0.20	0.80	0.80	0.40	0.40
Herba sept IVr	MIK	-	0.80	0.60	0.60	0.60	0.40	0.40	0.60	0.40	0.60	0.60
	MBK/ MFK	-	-	0.80	0.80	0.80	-	-	0.80	-	0.80	0.80
Herba sept Vr	MIK	0.80	-	0.60	0.40	-	0.80	0.40	0.60	0.80	0.60	0.60
	MBK/ MFK	-	-	0.80	0.80	-		0.80	0.80	-	0.80	0.80
streptomic in	MIK	0.08	0.10	0.04	0.02	0.04	0.01	0.02	0.10	0.15	-	-
	MBK	0.16	-	0.08	0.04	0.08	0.02	0.04	0.20	0.20		
ospamox	MIK	0.04 5	-	0.002	0.006	0.50	0.001	-	0.03	0.09	nt	nt
	MBK	0.06	-	0,004	0,008	-	0,002	-	0.06	0.12	nt	nt

pancef	MIK	0.50	0.50	0.06	0.006	0.045	0.004	0.12	0.06	0.50	nt	nt
	MBK	-	-	0.12	0.008	0.06	0.008	0.50	0.12	-	nt	nt
sinacilin	MIK	0.04 5	0.25	0.002	0.09	0.35	0.35	-	0.006	0.20	nt	nt
	MBK	0.06	0.50	0.004	0.12	0.50	0.50	-	0.008	0.25	nt	nt
klacid	MIK	0.00 2	0.015	0.0005	0.0005	0.25	0.0005	0.015	0.0005	0.004	nt	nt
	MBK	0.03	0.03	0.001	0.001	0.50	0.001	0.03	0.001	0.008	nt	nt
cefaleksin	MIK	0.06	0.12	0.003	0.004	0.001	0.0005	0.25	0.02	0.08	nt	nt
	MBK	0.12	0.50	0.004	0.008	0.002	0.001	0.50	0.03	0.12	nt	nt
nistatin	MIK	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.002	0.0007
	MBK	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.003	0.0015

- Sem efeito sobre os microrganismos testados;

nt - não testado;

