



SCREENING ANTIBACTERIANO DO (+)- α – PINENO FRENTE A CEPAS BACTERIANAS GRAM NEGATIVAS

Ticiane Costa Farias¹; Letícia de Sousa Eduardo²; Zilka Nanes Lima³. Sávio Benvindo Ferreira⁴.

1Aluna do curso de Medicina da Universidade Federal de Campina Grande - Centro de Formação de Professores, campus Cajazeiras – PB ticiane_92@hotmail.com

2Aluna do curso de Enfermagem da Universidade Federal de Campina Grande - Centro de Formação de Professores, campus Cajazeiras – PB leticialivesousa@gmail.com

3 Professora do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB zilkananeslima@gmail.com

4 Professor da Unidade Acadêmica de Enfermagem (UAENF) da Universidade Federal de Campina Grande - Centro de Formação de Professores, campus Cajazeiras – PB saviobenvindo@gmail.com

Resumo: O uso de plantas para o tratamento de doenças está inserido na sabedoria popular, e vem se desenvolvendo ao longo dos séculos em diferentes localidades do mundo. Enquanto isso, no âmbito científico, extratos e óleos essenciais provenientes de plantas são utilizados como fontes naturais de novos compostos para combater infecções bacterianas. Como alternativa antimicrobiana de fonte natural, surge o (+) – α – pineno, monoterpene presente em óleos essenciais, que será o fitoconstituente utilizado nesta pesquisa. Determinar o espectro de ação antimicrobiana do enantiômero positivo do α – pineno frente a cepas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* ATCC 25933. Para determinar a atividade antimicrobiana do fitoconstituente, aplicou-se o método de difusão em disco. Foi utilizado o fitoconstituente (+) – α – pineno, dissolvido em Tween 80 a 1% e DMSO em uma proporção de 5%, além de água destilada. Para se obter as demais concentrações necessárias para o experimento, realizou-se um procedimento de diluição em série, com o auxílio de eppendorfs. Após isso, foi realizado o inóculo bacteriano, no qual foram selecionadas colônias isoladas das placas de ágar. As placas de Ágar Mueller Hinton inoculadas com *Escherichia coli* apresentaram halo de inibição cuja média aritmética resultou em 12 mm de diâmetro na concentração de 160 μ L/mL de (+) – α – pineno, enquanto isso, as placas de Ágar Mueller Hinton inoculadas com *Pseudomonas aeruginosa* e com *Proteus mirabilis* não apresentaram halo de inibição.

Palavras-chave: α – pineno, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*. Difusão.



INTRODUÇÃO

O uso de plantas para o tratamento de doenças está inserido na sabedoria popular, e vem se desenvolvendo ao longo dos séculos em diferentes localidades do mundo. Enquanto isso, no âmbito científico, extratos e óleos essenciais provenientes de plantas são utilizados como fontes naturais de novos compostos para combater infecções bacterianas. Essas pesquisas são motivadas por causa do consumo indiscriminado de antibióticos, associado, simultaneamente, com a queda na descoberta de novos fármacos com propriedades antimicrobianas, vem surgindo em todo o mundo um aumento de bactérias cada vez mais resistentes (WANNMACHER, 2004; MOTA et al, 2005).

Dentro deste grupo, podemos evidenciar algumas espécies bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, principal causadora de infecções hospitalares entre os bacilos Gram-negativos não-fermentadores de glicose, cujos pacientes imunossuprimidos estão entre os mais afetados. Além disso, *P. aeruginosa* está frequentemente associada a infecções do trato urinário, pneumonias, infecções pós-cirúrgicas, bacteremias e peritonites em pacientes submetidos a diálise peritoneal (FERREIRA; LALA, 2010). Vale ressaltar que, a espécie *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos é um patógeno oportunista hospitalar que possui uma significativa resistência aos antibióticos, ocupando a segunda posição na lista das dez superbactérias que precisam urgentemente de novos antibióticos, divulgada em fevereiro de 2017 pela WHO (*World Health Organization*); *Proteus mirabilis* responsável por causar inúmeras infecções, em especial, na pele, nos tratos respiratório e urinário, em feridas. Os fatores de virulência deste micro-organismo estão associados aos seus mecanismos de adesão, motilidade, formação de biofilme, dentre outros. Já a *Escherichia coli*, participa da microbiota intestinal, contudo, pode tornar-se patogênico em localizações extraintestinal ou mesmo intestinal, tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes imunodeprimidos.

Como alternativa antimicrobiana de fonte natural, surge o (+) – α – pineno, fitoconstituente utilizado nesta pesquisa, monoterpeneo presente nos óleos voláteis, é constituído por diversas estruturas químicas baseadas em duas unidades de isopreno (C₁₀), sendo mais comumente encontrado na América do Norte. A mistura racêmica entre os enantiômeros positivo e negativo pode ser encontrado em alguns óleos essenciais, tais como óleo de eucalipto (NÓBREGA, 2013)

Diante disso, esta pesquisa teve o propósito de determinar o espectro de ação antimicrobiana do (+) – α – pineno frente a cepas padrão ATTC (*American Type Culture*



Collection): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* ATCC 25933.

METODOLOGIA

Local da Pesquisa

Os ensaios laboratoriais foram realizados no Laboratório de Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Centro de Formação de Professores da Universidade Federal de Campina Grande campus de Cajazeiras.

Substância Teste

Foi utilizado o fitoconstituente (+) – α – pineno, obtido da empresa Sigma-Aldrich do Brasil Ltda., situada em São Paulo, sendo adquirido com recursos próprios. As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-os primeiramente em Tween 80 a 1% e DMSO em uma proporção de 5%, e utilizando água destilada estéril para alcançar as concentrações desejadas.

Micro-organismos

A atividade antibacteriana do (+) – α – pineno foi avaliada contra três cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* ATCC 25933, cedidas pela professora Me. Zilka Nanes Lima da Universidade Estadual da Paraíba.

Meios de Cultura

Na execução dos testes para avaliação da atividade antibacteriana do fitoconstituente, os meios de cultura utilizados foram o Ágar Müeller-Hinton (HIMEDIA, Índia). Antes de sua utilização, os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Repique das Cepas Bacterianas

O uso e a manutenção de culturas microbianas são possíveis devido ao desenvolvimento de estoques de cepas bacterianas, que podem ser manipuladas para fins laboratoriais em determinadas ocasiões (GIRÃO et al, 2004).

O repique contínuo ou repicagem periódica das cepas bacterianas foi realizado com semeio das espécies estudadas (Figura 1) através da técnica de semeadura por esgotamento em Ágar Müeller-Hinton (HIMEDIA, Índia) e levadas



a estufa por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, por ser um ambiente que permitia a multiplicação bacteriana, com posterior encubação em local refrigerado, após o uso. Portanto, foi possível preservar os micro-organismos estudados, de modo que, quando necessário, eles estivessem disponíveis ao longo do experimento.

Figura 1: Placas com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* ATCC 25933 inoculadas em Ágar Mueller-Hinton utilizando a técnica de semeadura por esgotamento.



Inóculo Bacteriano

Passado o período de incubação, foi preparado o inóculo fazendo uma suspensão direta, em solução salina, de colônias isoladas selecionadas. Em seguida, a suspensão foi ajustada para que apresentasse turvação semelhante à escala 0,5 de McFarland, que corresponde a 1×10^8 UFC/mL (CLSI, 2005).

Um swab de algodão estéril foi mergulhado na suspensão ajustada, girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, com o intuito de retirar qualquer excesso de inóculo no swab. A superfície seca da placa de Ágar Müller-Hinton (AMH) foi inoculada esfregando o swab em toda a superfície estéril do meio. Repetiu-se o procedimento esfregando outras três vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Ao final, passou-se o swab na margem da placa de ágar, de forma circular por duas vezes, fechando o inóculo.

Diluição Seriada do Fitoconstituente

As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-os primeiramente em fitoconstituente em Tween 80 a 1% e DMSO em uma proporção de 5%, e



utilizando água destilada estéril para alcançar as concentrações desejadas.

Para realização do teste, foram aplicados 20 μL da solução do (+) – α – pineno em discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro, nas diferentes concentrações a serem testadas variando de 160 a 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Seis discos impregnados com seis concentrações diferentes de α – pineno, 160 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, foram colocados na superfície de uma placa de AMH semeada.

Figura 2: Eppendorfs com as concentrações do fitoconstituente (+) – α – pineno (160 a 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$)

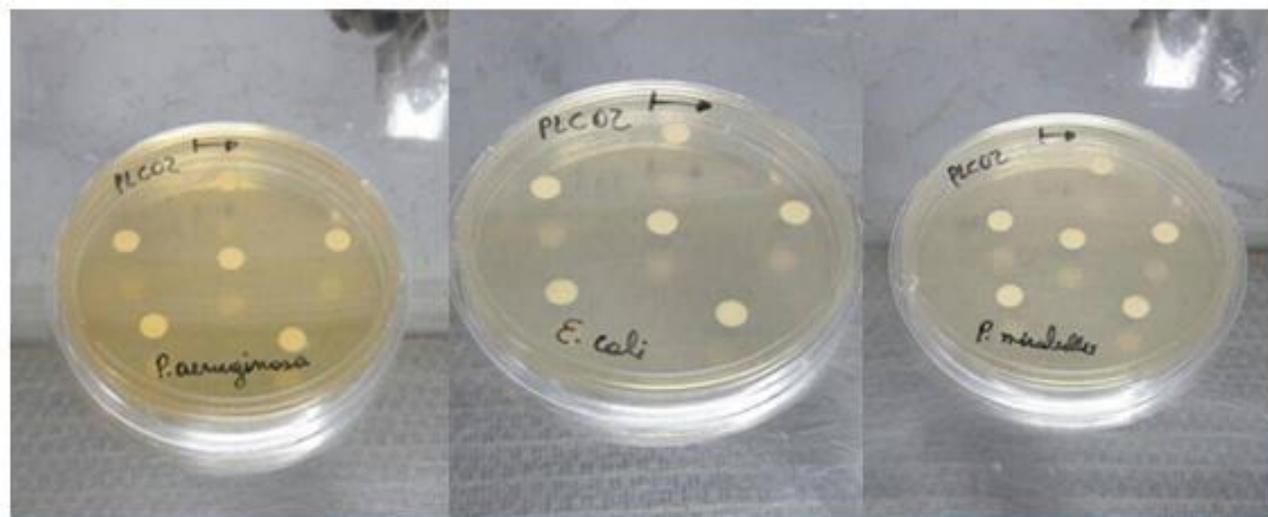


Teste de Difusão em Disco

O teste de difusão em disco é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Cada disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície de ágar, sendo aplicados individualmente e distribuídos por igual, de maneira que a distância de centro para centro não excedesse 24 mm. As placas foram invertidas e colocadas numa estufa, a 35° C, após a aplicação dos discos. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 \pm 2°C por 24-48 horas, para realização da leitura (CLSI, 2005). A leitura dos resultados foi realizada medindo-se o diâmetro dos halos, em mm, formados ao redor dos discos contendo o fitoconstituente.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas três repetições, em milímetros (mm). Foi positivo caso o composto apresente halo maior ou igual a 6 mm (diâmetro do disco) (SMÂNIA et al, 1995).

Figura 3: Placas de Ágar Müller-Hinton semeadas com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Proteus mirabilis* ATCC 25933 inoculadas com os discos contendo (+)- α -pineno em diferentes concentrações.



RESULTADOS E DISCUSSÕES

O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detectável a olho nu. Portanto, as placas de Petri foram colocadas poucas polegadas acima de um fundo não refletor, iluminadas com luz refletida, e os diâmetros dos halos de inibição total (julgadas a olho nu) foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco, com o auxílio de uma régua, que foi encostada na parte de trás da placa de Petri invertida (CLSI, 2005).

A tabela 1 foi elaborada com o objetivo de indicar os tamanhos dos halos de inibição (em mm) que foram formados ou não pelos micro-organismos estudados, cujos valores representam a média aritmética dos resultados em triplicata.

Tabela 1: Diâmetro (mm) dos halos de inibição dos micro-organismos frente a diferentes concentrações do (+)- α -pineno

Micro-organismos	Concentração do (+)- α -pineno em $\mu\text{L/mL}$					
	160	80	40	20	10	5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12	≤ 6				
<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6

Após 24 horas de incubação, cada placa foi examinada e apresentou halos de inibição resultantes em formato circular para a espécie *Escherichia coli* ATCC 25922 (Figura 4), enquanto isso, os outros micro-organismos estudados não apresentaram a formação de nenhum halo, sendo eles: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Proteus mirabilis* ATCC 25933 (Figura 5).

Figura 4: Placa de Ágar Müller Hinton inoculada com *E. coli* ATCC 25922, apresentando um halo de inibição ao redor do disco de difusão impregnado com 160 $\mu\text{L/mL}$ de (+) - α - pineno

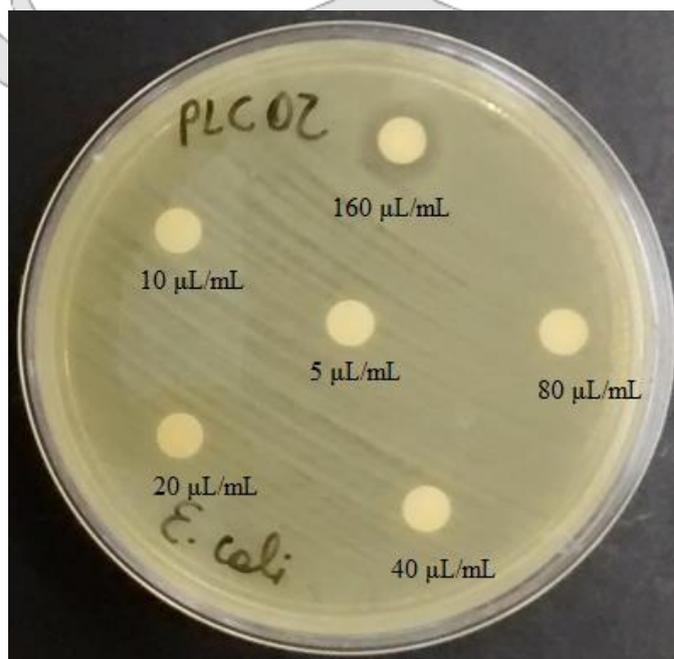
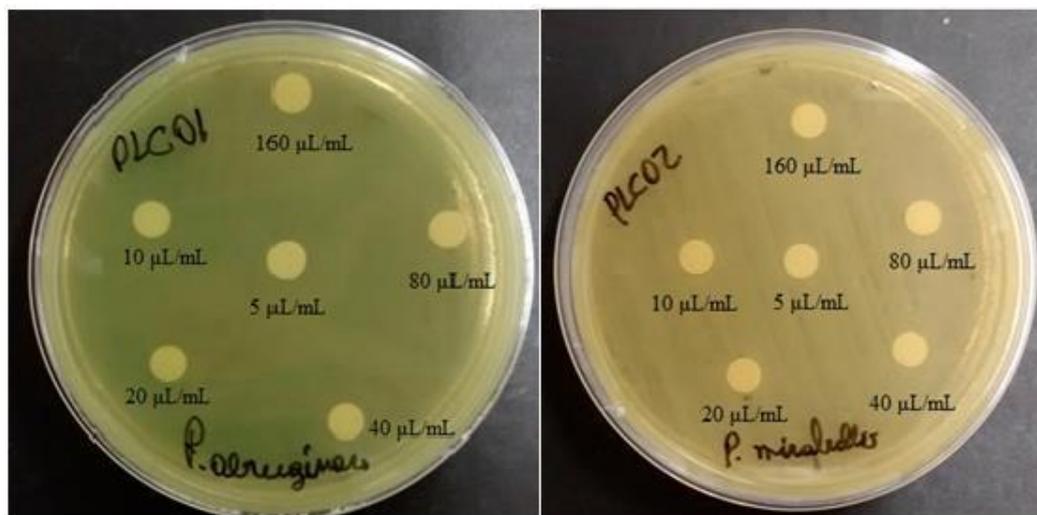


Figura 5: Placa PLC01 de AMH inoculada com *P. aeruginosa* ATCC 27853 e Placa PLC02 inoculada com *Proteus mirabilis* ATCC 25933, ambas sem formar qualquer halo de inibição.



Esta pesquisa é pioneira na avaliação da atividade antibacteriana do enantiômero positivo do α -pineno contra cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*, tendo em vista que não há relatos na literatura de estudos contras estas bactérias gram-negativas.

Na literatura, há pesquisas utilizando óleos essenciais extraídos de plantas que possuem a mistura racêmica do α -pineno, seja como fitoconstituente majoritário ou não. Além disso, há a pesquisa de Silva et al (2012) envolvendo o estudo sobre a atividade dos enantiômeros positivo e negativo do α -pineno contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhizopus oryzae* e *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Ramdani et al (2013) pesquisaram a atividade bacteriana do óleo de *Juniperus phoenicea*, que possui o alfa pineno como componente majoritário, e perceberam que para *Escherichia coli* o óleo apresentava atividade bacteriana, entretanto, com eficiência inferior aos resultados de teste de difusão de bactérias gram-positivas.

Mazari et al (2010) pesquisaram a atividade bacteriana dos óleos de *Juniperus phoenice* L. e *Cupressus sempervirens* L para algumas bactérias, dentre elas *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Eles utilizaram teste de difusão em disco e os resultados mostraram que houve uma produção de halos variando entre 6,8 a 15,6 mm de acordo com a bactéria testada, contudo, essas zonas de inibição apresentaram-se menores quando comparadas aos antibióticos-padrão utilizados nos testes.



Houve a formação de um halo de inibição de 9,6 mm para *E. coli* para o óleo essencial de *J. phoenicea*, enquanto o óleo de *C. sempervirens* não apresentou atividade bacteriana. Além disso, *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se resistente aos dois óleos.

Em uma pesquisa avaliando a composição do óleo extraído da *Salvia officinalis* coletado na Síria e a sua atividade antibiótica para algumas bactérias e fungos, dentre elas, *Escherichia coli* O157:H7 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Khalil e Li (2011) observaram que, apesar do efeito inibitório do óleo essencial contra *E. coli*, as bactérias retomaram o seu crescimento após 24h a concentrações de 5 e 10 µL/mL, e que a espécie *P. aeruginosa* resistentes ao óleo essencial.

CONCLUSÕES

Após a realização do experimento, pode-se concluir que, de acordo com o teste de difusão em disco, o (+) – α – pineno, na concentração de 160 µL/mL, foi capaz de inibir o crescimento da espécie *Escherichia coli* ATCC 25922, por apresentar halos de inibição, cuja média aritmética foi de 12 mm de diâmetro, enquanto os demais micro-organismos apresentaram resistência ao (+) – α – pineno. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos, com a aplicação de outras metodologias, para determinar mais precisamente a atividade antimicrobiana e a existência de possíveis efeitos tóxicos desse fitoconstituente.

REFERÊNCIAS

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada - 8ª ed. M2-8, vol. 23, n.1. Substitui a Norma M2-A7, v.20, n.1. 2005.

FERREIRA, H.; LALA, E. R. P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana de Infectologia** 2010;12(2):44-50.

GIRÃO, M. D et al. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.37, n.3, p. 229-233, mai/jun. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822004000300007> Acesso em: 12 mar 2017

KHALIL, R.; LI, Zheng-Guo. Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 10(42), pp. 8397-8402, 8 August, 2011. DOI: 10.5897/AJB10.2615.

MAZARI, K. BENDIMERAD, N. BEKHECHI, C.; FERNANDEZ, X. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. **Journal of Medicinal Plants Research** Vol.



4(10), pp. 959-964, 18 May, 2010. DOI: 10.5897/JMPR10.169

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

NÓBREGA, F.M. **Investigação da atividade antifúngica do alfa-pineno sobre cepas de Rhizopus oryzea.** (Monografia), 2013.

RAMDANI, M. LOGRADA, TAKIA, SILINI, et al . H. Antibacterial Activity of Essential oils of Juniperus phoenicea from Eastern Algeria. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** Vol. 3 (11), pp. 022-028, November, 2013. DOI: 10.7324/JAPS.2013.31105

SILVA, A.C.R. et al. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. **Molecules**, 17, 6305-6316, 2012.

WANNMACHER, Lenita. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida?**. ISSN 1810-0791 Vol. 1, Nº 4 Brasília, Março de 2004. Disponível em: <http://www.opas.org.br/medicamentos/docs/HSE_URM_ATB_0304.pdf> Acesso em: 12 mar 2017

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. [Online]. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>> Acesso em: 12 mar 2017

