

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ENÂNTIOMERO POSITIVO DO A-PINENO FRENTE ÀS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* E *Enterococcus faecalis*

Letícia de Sousa Eduardo¹; Ticiane Costa Farias²; Zilka Nanes Lima³; Sávio Benvindo Ferreira³.

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

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

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

4 Professor Substituto 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 indiscriminado de antibióticos contribui para que haja a resistência antibacteriana, o que representa um problema para a saúde humana. Um composto que está sendo explorado é o (+) – α – pineno, um monoterpeno presente em óleos essenciais e vem demonstrando possuir efeito contra cepas positivas e negativas. Desse modo, buscando conhecer esse monoterpeno, este estudo busca investigar sua atividade antibacteriana frente a cepas padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 25212. Para determinar a atividade antimicrobiana do fitoconstituente, aplicou-se o método de difusão em disco. Para isso, 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 com as concentrações: 160-80-40-20-10-5 μ L. Após isso, foi realizado o inóculo bacteriano, no qual foram selecionadas colônias isoladas das placas contento o caldo de Ágar Mueller-Hinton. Os resultados mostraram que houve formação de halo de inibição de 11 mm para a cepa *S.aureus*. Quanto à cepa de *E. faecalis*, evidenciou-se que não houve formação de halo de inibição ao redor do disco. Conclui-se que a substância promissora, (+) – α – pineno na concentração de 160 μ L/mL foi capaz de inibir o crescimento da cepa *S.aureus*. Nessa perspectiva, sugere-se que novas pesquisas sejam feitas para uma melhor caracterização da ação antibacteriana do fitoconstituente.

Palavras-chave: Produtos naturais, Efeito bacteriano, α -pineno.

INTRODUÇÃO

Devido à exposição crescente aos antibacterianos, o organismo humano passou a adquirir resistência contra esses fármacos, gerando assim, um problema de saúde pública, uma vez que contribui para o aparecimento de doenças infecciosas, que se tornam cada vez mais difíceis de combater.

Nesse contexto, dentro do grupo de bactérias resistentes, destaca-se a cepa *Enterococcus faecalis*, que pode estar presentes no ambiente hospitalar, local onde os antibióticos são muito utilizados, favorecendo assim, a sobrevivência e disseminação de micro-organismos resistentes. Nesse caso, o aumento da resistência de enterococos, entre os seres humanos, também pode estar relacionado ao uso indiscriminado de antimicrobianos (PERUGINI et al 2015).

Além disso, o gênero *Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos, sendo considerado responsável por severas infecções em humanos. Esse patógeno pode provocar desde uma infecção cutânea de pouca importância até uma ampla gama de doenças, incluindo infecções sistêmicas potencialmente fatais, infecções oportunistas e doença das vias urinárias (TRABULSI, 2008; LIMA et al., 2015).

Sendo assim, em decorrência do aumento da resistência bacteriana, a busca por compostos com ação antimicrobiana derivadas de plantas teve um grande impulso, visto que as plantas são utilizadas no tratamento e cura de patologias desde os primórdios da sociedade, sendo, portanto, largamente utilizada na medicina popular, devido suas vantagens econômicas, facilidade de obtenção, bem como sua aplicabilidade para diversas doenças.

De modo, conforme Sarto e Junior (2014), nessa busca por antimicrobianos de fonte natural, destacam-se os óleos essenciais, que são misturas complexas de compostos aromáticos voláteis provenientes do metabolismo secundário de vegetais, e que possuem vários componentes químicos responsáveis pelas suas propriedades terapêuticas e organolépticas, dentre eles, há uma classe denominada de monoterpenos.

Os efeitos antibacterianos de óleos essenciais contendo o α -pineno, seja como constituinte majoritário ou em pequenas concentrações, vêm sendo estudados e comprovados cientificamente (NÓBREGA, 2013).

Nesse sentido, tendo em vista o potencial terapêutico apresentado pelos óleos essenciais e os seus fitoconstituintes, o presente estudo busca analisar a atividade antibacteriana do monoterpeno, α -pineno sobre cepas de *S. aureus* e *E. faecalis*, que tem se mostrado como um problema de saúde pública.



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, adquirido com recursos próprios. As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, sendo utilizados dois solventes para dissolver o fitoconstituente, tais como: Tween a 1% e Dimetilsulfóxido (DMSO) em uma proporção de 5%, além da água destilada estéril para alcançar as concentrações desejadas.

Micro-organismos

A atividade antibacteriana do (+) – α – pineno foi avaliada contra duas cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) gram positivas: *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212, 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, inicialmente foi preparado o caldo de Ágar Mueller-Hinton. Pesou-se 7,6 g do caldo e em seguida foi introduzido no volume de 200 ml de água destilada em um erlenmeyer. E levado para o Agitador magnético com aquecimento por 15 minutos. Vale salientar que antes da utilização, os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Nesse contexto, utilizou-se uma ou duas colônias das cepas *S. aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212, que foram cedidas e realizou-se a técnica de esgotamento na placa contendo o meio cultura que foi preparado. Os meios foram levados a estufa por 24 horas para o crescimento.

Execução do Método de Difusão em Disco

Para determinar a atividade antimicrobiana do fitoconstituente, aplicou-se o método de difusão em disco de acordo com NCCLS (2003), que é aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) (BARRY; THORNSBERRY, 1991). Além disso, ele é empregado para a determinação de atividades antibacterianas.

Desse modo, em um eppendorf foi preparado a solução com as seguintes concentrações: (+) – α – pineno (160 μ L); Tween (10 μ L); DMSO (50 μ L) e Água destilada estéril (780 μ L) totalizando 1000 μ L de solução. Em seguida, foi realizada a diluição em série utilizando seis eppendorfs com as concentrações do fitoconstituente (+) – α – pineno (160 a 5 μ L), sendo o eppendorf com 160 μ L o de maior concentração e a de 5 μ L menor concentração do fitoconstituente. Feito a diluição supracitada, foi realizado o Inóculo bacteriano, no qual foram selecionadas duas ou três colônias, isoladas das placas de ágar. A superfície de cada colônia foi tocada com uma alça, e cada cepa foram transferidas para seus respectivos tubos de ensaio, que possuía 3 ml de solução salina.

Neste sentido, após a incubação foi realizado o controle de turbidez, no qual objetiva padronizar a densidade do inóculo, ou seja, estes devem apresentar uma turvação semelhante a escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL).

Inoculação das Placas de Teste

O swab de algodão estéril foi introduzido na suspensão ajustada, até 15 minutos após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo. O swab foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido. Ajudando assim, a retirar qualquer excesso de inóculo no swab. Sendo assim, a placa de petri contendo o meio de cultura- ágar Mueller-Hinton foi semeada através do esfregaço feito com o swab em toda a superfície estéril do ágar. Este procedimento foi repetido esfregando outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se o swab na margem da placa de ágar.

Distribuição dos discos nas placas inoculadas

Após a incubação, para cada micro-organismos (*S. aureus* e *E. faecalis*) foram distribuídas 6 discos de papel filtro de 6 mm para cada cepa bacteriana em três placas de petri,



visto que o ensaio foi realizado em triplicata.

Feito isto, por meio da pipeta automática foi transferido de 20 μL de cada concentração presente no eppendorf (160-80-40-20-10-5 μL) com fitoconstituente para os discos das placas de Petri. Além disso, a fim de avaliar a ausência de interferência dos solventes utilizados na dissolução do fitoconstituente: DMSO (até 10%) e Tween 80 (1%), realizou-se um controle no qual foram colocados nos discos de papel 20 μL dos solventes, DMSO (até 10%), Tween 80 (2%).

Como controle negativo, utilizou-se o disco do antibacteriano padrão Amicacina (10 μg). Os discos foram transferidos para o meio de Ágar Mueller-Hinton presente nas placas de Petri, estas foram assepticamente fechadas e em seguida incubadas a 28 °C por 24-48 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta pesquisa é pioneira na avaliação da atividade antibacteriana do enantiômero positivo do α -pineno contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 25212, tendo em vista que não há relatos na literatura de estudos contras estas bactérias gram-positivas.

Os resultados foram expressos pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas três repetições, em milímetros (mm), conforme a tabela 1. Os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em milímetros, usando uma régua.

Evidenciou-se que houve a formação de halo de inibição de 11 mm para a espécie bacteriana *S. aureus*, especificamente na concentração de 160 $\mu\text{L}/\text{mL}$, demonstrando assim, que esta cepa bacteriana apresenta sensibilidade frente ao (+) – α – pineno, conforme Figura 1 abaixo. Quanto às demais concentrações 80-40-20-10-5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, o fitoconstituente mostrou-se incapaz de inibir o crescimento bacteriano.

Enquanto que, para a cepa de *E. faecalis*, observa-se que o (+)- α -pineno não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em nenhuma concentração, como observado na Figura 2.

Figura 1: Placa de Ágar *Müller Hinton* inoculada com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com discos de papel de filtro impregnados com diluições do (+) – α – pineno (160 – 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

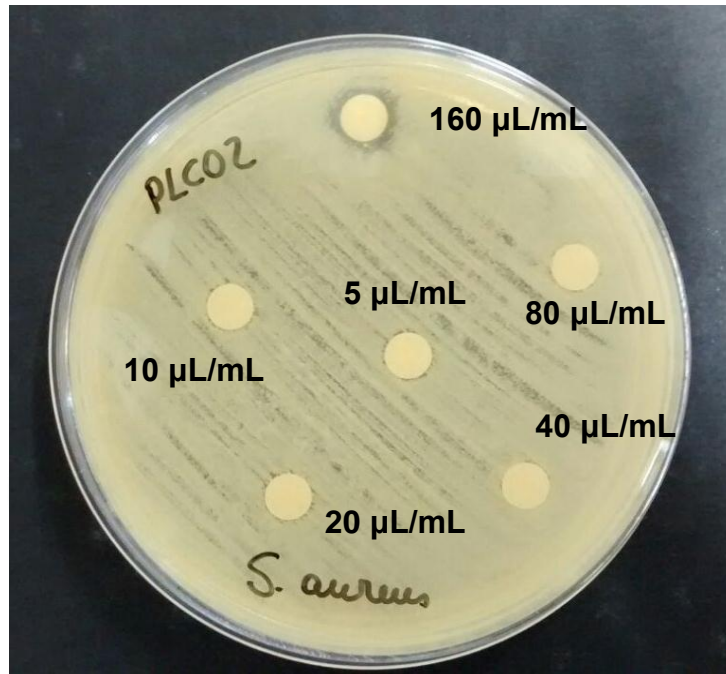
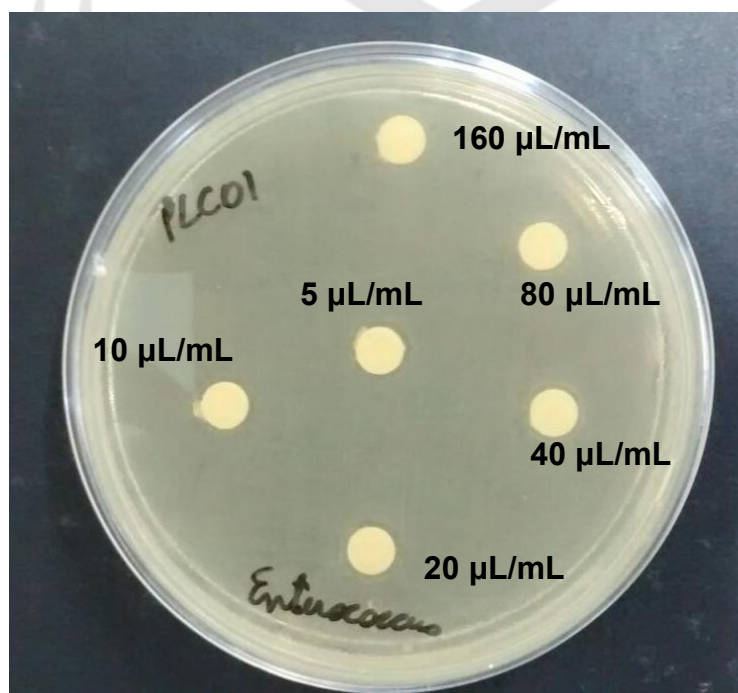


Figura 2: Placa de Ágar *Müller Hinton* inoculada com *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 após 24 horas de incubação.





Segundo, Masruri e Rahman (2016), o alfa-pineno é um composto monoterpenoide, um grupo de membros do produto natural do metabolito secundário. Contém 10 carbonos com uma única ligação dupla C = C e é Bicíclico. Além disso, o autor afirma que este composto age na redução da inflamação no nível celular, bem como inibindo o crescimento bacteriano.

Um estudo realizado pelos autores Mazari et al. (2010) buscava avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais *J. phoenicea* e *C. sempervirens*, frente a duas bactérias gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e três gram negativas: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, por meio do teste de difusão em disco e da concentração inibitória mínima (CIM). Esses óleos tinham na sua composição o α -pineno, β -phellandreno e acetato de α -terpinilo como os principais constituintes.

Desse modo, os resultados mostraram que os óleos inibiram as bactérias, produzindo um diâmetro de zona de inibição que variaram de 6,8 - 15,6 mm, sendo que a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 apresentou um diâmetro de inibição de 10,3 mm, o que evidencia uma aproximação com o halo de inibição que foi formado neste estudo. Quanto à cepa de *Enterococcus faecalis*, esta se apresentou como o mais sensível micro-organismo, com a zona de inibição mais alta (15,6 mm) frente aos óleos *J. phoenicea* e *C. sempervirens*.

Outro estudo realizado por Khalil e Li (2011) buscou avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Salvia officinalis* recolhidos da Síria frente às bactérias: *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhi* O:9,12, Vi - H: d, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus group D* e *Candida albicans* (ATCC 10239). Dentre os principais constituintes do óleo extraído das plantas encontrava-se o α -pineno. Sendo assim, os resultados mostraram que o óleo essencial de *S. officinalis* foi capaz de inibir completamente o crescimento de bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus group D* na concentração de 20 μ l / ml. A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi mais definida contra bactérias Gram-positivas do que contra bactérias Gram-negativas, uma vez que a resistência das bactérias Gram-negativas pode ser devido à existência da membrana fosfolipídica externa, que age limitando o efeito do óleo essencial sobre a membrana celular (KHALIL; LI, 2011).

O estudo realizado pelos autores Masruri e Rahman (2016) objetivava identificar sobre oxidação de alfa pineno catalisada por permanganato e seus compostos complexos com zinco (II) e cobre (II) utilizando o teste de difusão em disco e o método de diluição do tubo. Além disso, avaliou a atividade destes compostos para inibição do crescimento bacteriano das



cepas: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Desse modo, a atividade bacteriana testada obteve inibição do crescimento bacteriano dessas cepas.

Os autores Ramdani et al (2013) buscaram investigar a composição química do óleo de *J. phoenicea* obtido de plantas que crescem no leste da Argélia, bem como avaliar sua atividade antimicrobiana frente as cepas Gram positivas (*Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e as Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas syringae*, *Salmonella sp*, *Serratia liquefaciens* ATCC 27592, *Serratia marcescens* ATCC 14756, e *Shigella sp*). Os resultados desse estudo identificaram que o óleo supracitado apresenta como constituinte majoritário o alfa-pineno (36,3-55,9%). Além disso, evidenciou-se que o óleo inibiu o crescimento das espécies bacterianas, produzindo um diâmetro de zona de inibição de 7 - 45 mm. Quanto às cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *Shigella sp*, o óleo apresentou atividade antibacteriana moderada.

Nessa perspectiva, conforme a Tabela 1 abaixo, a cepa de *E. faecalis* mostrou-se resistente contra o fitoconstituente na concentração 160 $\mu\text{L/mL}$, visto que não houve a formação de halo de inibição, evidenciando assim, que o (+) - α - pineno não possui atividade antibacteriana em nenhuma das concentrações apresentadas.

Tabela 1: Halos de inibição de crescimento (mm) do (+) - α - pineno pelo método de disco-difusão em meio sólido em diferentes concentrações frente as cepas *S. aureus* e *E. faecalis*

Micro-organismos	Concentração do (+)- α -pineno em ($\mu\text{L/mL}$)					
	160	80	40	20	10	5
<i>E. faecalis</i>	11	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6
<i>S. aureus</i>	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6	≤ 6

CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o alfa pineno na concentração de 160 $\mu\text{L/mL}$ possui atividade antimicrobiana contra a cepa *S. aureus* ATCC 25923, demonstrada pela formação do halo de inibição de 11 mm diâmetro. Porém, não apresenta atividade contra a cepa *E. faecalis* ATCC 25212, visto que não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas neste estudo. Desse modo, sugere-se que novas pesquisas sejam

realizadas, para melhor caracterização da atividade do composto, bem como sua toxicidade.

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.

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.

LIMA, M.F. P et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – revisão de literatura. **Revista UNINGÁ Review**. Vol.21,n.1,pp.32-39, 2015. DOI: ISSN online 2178-2571.

MASRURI, R. W. A.; RAHMAN, M. F. Potassium Permanganate-Catalyzed Alpha-Pinene Oxidation: Formation of Coordination Compound with Zinc(II) and Copper(II), and Growth Inhibition Activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Indones. J. Chem.**, V.16, n 1, p. 59 – 64, 2016.

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

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

PERUGINI, M.R.E. et al. Enterococcus spp. resistentes à vancomicina: características clínicas e fatores de risco. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 36, n. 1, supl, p. 291-300, 2015. DOI: 10.5433/1679-0367.2014v35n2p291

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

SARTO, M.P. M; JUNIOR, G. Z. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista UNINGÁ Review**. Vol.20,n.1,pp.98-102, 2014. DOI: ISSN online 2178-2571

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

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F. Microbiologia, Atheneu, Sao Paulo. Turina, A. et al. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**. 122, 101-113, 2008.