

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO E EXTRATOS DE *PINUS PINASTER* SOBRE *STREPTOCOCCUS SP*

Ellen Bernardi, Giancarlo Melchior do Prado, Sandra Inês Agnes
(Orientador/UNICS), e-mail pequena_don@hotmail.com

UNICS – Centro Universitário Católico do Sudoeste do Paraná -Palmas -PR.

Palavras-chave: *Pinus pinaster*, extratos, atividade antimicrobiana.

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo volátil obtido através de hidrodestilação e dos extratos obtidos através de maceração, infusão e decocto extraídos de *Pinus Pinaster* sobre a bactéria *Streptococcus sp*. A atividade antimicrobiana contra a bactéria *Streptococcus sp* foi investigada pelo método de difusão em discos. O rendimento do óleo foi baixo, mas o suficiente para a investigação da atividade antimicrobiana evidenciada contra *streptococcus sp*, sendo que o extrato de óleo essencial obtido por hidrodestilação mostrou-se mais eficiente na inibição do crescimento do microrganismo formando halos de inibição. Os resultados obtidos com os extratos de *Pinus Pinaster* apontam a necessidade da realização de novos estudos, pois as agulhas de *Pinus Pinaster* demonstram possuir considerável potencial antimicrobiano.

Introdução

As qualidades anti-sépticas de plantas aromáticas e medicinais e de seus extratos vêm sendo reconhecidas desde a antiguidade, tendo os óleos essenciais merecido destaque especial com relação a estas atividades.

Os óleos essenciais são geralmente isolados de plantas por métodos de destilação por vapor ou hidrodestilação. São, de uma maneira geral, misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, constituídos essencialmente de misturas variadas de terpenóides.

As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais e extratos de plantas e de seus constituintes foram estudadas por vários autores (SIMÕES E SPITZER, 1999). Pesquisas da atividade antimicrobiana, modo de ação e uso potencial de óleos essenciais de plantas tem ganhado importância, pois se está em busca constante de novos fármacos com atividade biológica.

O óleo essencial de *Pinus pinaster* possui características de anti-infeccioso, antifúngico, anti-séptico, tônico, expectorante peitoral, diurético, estimulante, depurativo, restaurador, refrescante, desodorante, descongestionante, sudorífero, estimulante da glândula adrenal. É constituído principalmente pelo silvestreno, pineno, acetato de bornila, pumilono, dipenteno, cadineno, citral, felandreno, *que são* responsáveis pela ação farmacológica do óleo (REZNICEK & ZITTERL-EGLESEER, 2003).

A extração do óleo de *Pinus Pinaster* pode ser realizada a partir das agulhas (tipos de folhas do *pinus*), ramos (galhos) e brotos (parte mais jovem da árvore). O método mais utilizado para esta extração de óleo é a destilação a vapor, para se obter os principais componentes aromáticos de um material vegetal de interesse.

Em numerosas situações práticas há interesse em determinar a sensibilidade de uma espécie bacteriana a antibióticos ou produtos antibióticos naturais. Mais ainda: em geral é conveniente verificar a que antibióticos, a bactéria é sensível, quando se trata de extratos ou óleos essenciais, a investigação da composição química, para identificação do constituinte majoritário ou a soma dos constituintes responsáveis pela atividade antibiótica, ainda, a que outros apresenta resistência e que concentrações do óleo e extratos são efetivas.

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a atividade antimicrobiana obtida de óleo volátil e dos extratos do *Pinus Pinaster*.

Os objetivos específicos foram:

- Extração do óleo essencial das folhas frescas de *Pinus Pinaster* por hidrodestilação.
- Obtenção de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Pinus Pinaster*.
- Estudo da atividade antimicrobiana do óleo volátil e dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Pinus Pinaster* sobre *Streptococcus sp.*

Materiais e Métodos

Materiais

Para extração do óleo essencial do *Pinus Pinaster* empregou-se extrator Clevenger. Para obtenção dos extratos aquosos e alcoólicos e análises microbiológicas utilizou-se materiais convencionais de laboratório.

Amostras

Amostras de agulhas (folhas) de *Pinus Pinaster* foram retiradas na Fazenda Faxinal Grande, localizada em Laranjeiras do Sul (PR). As amostras foram homogeneizadas e divididas em diferentes lotes, os quais foram utilizados para a extração do óleo essencial e obtenção dos extratos brutos.

Microrganismo teste

A cultura de bactéria utilizada foi gentilmente cedida pelo Departamento de Biologia do Centro Universitário Diocesano do Sudoeste do Paraná- UNICS (Palmas – PR) sendo da espécie *Streptococcus sp.* (figura 1).

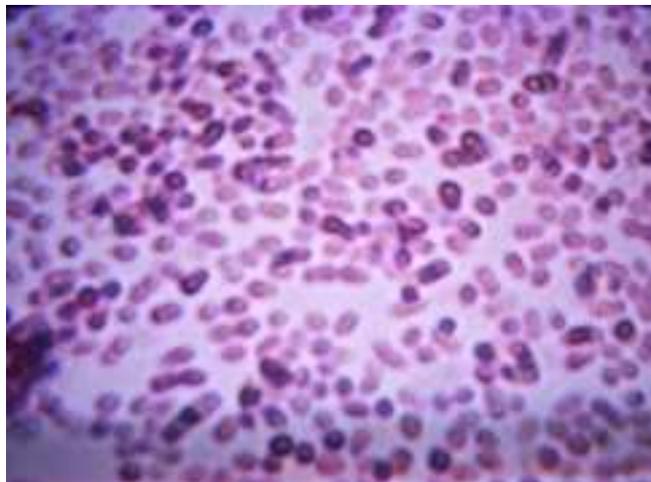


Figura 1 – Microrganismo teste (*Streptococcus sp.*).

A escolha deste microorganismo se deu em função da ação patogênica no organismo humano.

Métodos

Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Química Orgânica e de Microbiologia do Centro Universitário Diocesano do Sudoeste do Paraná (Palmas, PR).

Preparação dos extratos

Para o preparo dos extratos aquosos adotou-se metodologia proposta por RAUBER (2001) descrita a seguir.

Extratos aquosos

Os extratos aquosos foram preparados a partir de folhas frescas de *Pinus pinaster*. O infuso foi preparado vertendo-se água fervente sobre as folhas e fechando-se o recipiente. Deixou-se em repouso por quinze minutos, com posterior filtração. No preparo do decocto procedeu-se à ebulição das folhas com água, durante quinze minutos, com filtração a seguir. Os filtrados foram, posteriormente utilizados nos ensaios.

Macerado Hidroetanólico

O macerado hidroetanólico das agulhas de *Pinus pinaster* foi preparado na concentração de 0,5 g/mL em etanol, em etanol-água e ainda apenas em água.

Óleo volátil

O óleo volátil das agulhas (folhas) de *Pinus pinaster* foi extraído através de destilação com arraste de vapor de água (em processo contínuo), em aparelho de Clevenger, durante 4 horas, conforme indicado ANGNES, 2005.

A atividade antimicrobiana foi testada em placas de Petri pelo método de difusão em agar com discos de papel para os extratos e óleo extraídos de *Pinus Pinaster* proposto por TRABULSI, 2005.

Atividade antibacteriana

A bactéria utilizada neste procedimento foi o *streptococcus sp*, uma bactéria gram positiva que causa diversas doenças como por exemplo, as infecções agudas da garganta e da pele.

O trabalho foi realizado com cepas já isoladas, as quais foram inoculados em solução salina 0,9% e em seguida inoculou-se 100µl em placa de petri contendo Agar sangue, após semear com a alça de drigalski foram colocados os discos de papel filtro previamente esterilizados e embebidos no óleo volátil e para em cada extrato de *pinus pinaster*. As placas, 15 minutos após a colocação dos discos foram invertidas e incubadas a 37°C em estufa microbiológica. Após 24 horas de incubação, procedeu-se a leitura dos halos de inibição.

Segundo Trabulsi (2005. p 92) “adaptado”: Esta metodologia proporciona a avaliação qualitativa da sensibilidade, caracterizando os microorganismos testados como “sensíveis”, “intermediários” ou “resistentes” as drogas, neste caso, ao óleo volátil e extratos do *Pinus pinaster* testados. Para realização destes testes, discos de papel filtro são esterilizados e impregnados com óleo e aplicados sobre a superfície de placas de ágar (neste caso será utilizado o ágar-sangue) previamente semeado com o inóculo a ser testado (*Streptococcus sp*).

O óleo presente no disco se difunde no meio de cultura, de modo que a concentração de óleo e extratos decresce à medida que se distancia do disco, formando assim uma espécie de gradiente de concentração da droga ao redor dos discos. Conjuntamente com a difusão do óleo, o microorganismo inoculado na superfície deste meio de cultura e que não é inibido pela concentração do óleo continua a se multiplicar de modo que seu crescimento torna-se visível. Nas áreas onde a concentração do óleo é inibitória, não ocorre crescimento do microorganismo, formando-se, então, uma zona de inibição ao redor dos discos.

A atividade antimicrobiana foi testada em plascas de Petri pelo método de difusão em agar com discos de papel para os extratos e óleo extraídos de *Pinus Pinaster* proposto por Trabulsi, 2005

Resultados e Discussão

Obtenção do óleo essencial e extratos

O óleo volátil obtido pelo método de extração por hidrodestilação apresentou um odor forte e pungente característico, amadeirado, praticamente incolor.

Os rendimentos dos processos de extração estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Rendimento de óleo essencial do *Pinus Pinaster*

| Massa vegetal | Rendimento em gramas | Percentual | Literatura |
|---------------|----------------------|------------|------------|
| 200g | 0,66g | 0,33% | - |

- sem relatos encontrados na literatura

Pode-se observar que as agulhas de *Pinus Pinaster* apresentam um rendimento insatisfatório para comercialização como essência, no entanto vale salientar que verificada a sua eficácia como agente antimicrobiano, pode-se adequar um melhor método para sua extração.

Os extratos aquosos diferenciaram-se pela coloração: o macerado preparado em etanol apresentou uma coloração verde escura, o macerado preparado em água a coloração teve aspecto levemente esverdeada, e o macerado preparado em água e etanol a coloração caracterizou-se verde clara. Os extratos aquosos (o infuso e o decocto) apresentaram uma coloração semelhante, ligeiramente verde amadeirado.

Os extratos aquosos e alcoólicos foram preparados e testados diretamente sobre o microrganismo patogênico em estudo. Os solventes (água e etanol) utilizados para o preparo dos extratos não foram separados para determinação do rendimento do extrato bruto e preparo de diferentes concentrações para estudo da atividade biológica. Ficando como sugestão a realização dessas etapas em trabalhos futuros.

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos nos testes de atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo volátil de *Pinus pinaster* sobre a bactéria do tipo *Streptococcus sp.*

Tabela 2: Atividade antimicrobiana do óleo essencial e extratos de *Pinus Pinaster*.

| Óleo essencial e extratos de <i>Pinus Pinaster</i> | Atividade biológica sobre <i>streptococcus sp</i> |
|--|---|
| Óleo essencial puro (obtido por hidrodestilação) | +++ |
| Macerado Alcoólico (obtido por maceração com álcool) | +++ |
| Macerado Hidroalcoólico (obtido por maceração com álcool e água) | ++- |
| Macerado Hidrolato (obtido por maceração com água) | --- |

| | |
|---------------------------|-------|
| Extrato Aquoso (INFUSO) | - - - |
| Extrato Aquoso (DECOCTO) | - - - |
| Branco (Água) | - - - |
| Branco (Álcool) | + + - |

(+) se refere a formação de halo de inibição, (-) se refere a ausência de halo de inibição.

Ao se testar a atividade antimicrobiana do óleo essencial puro (obtido por hidrostilação) sobre *Streptococcus sp*, pode-se observar que houve formação de 3 halos inibitórios, mostrando a eficácia sobre o microrganismo em estudo, visível na figura 2.



Figura 2 - Halos de inibição formados pela atividade antimicrobiana do óleo puro sobre o *Streptococcus sp*.

Para o macerado alcoólico, observou-se a atividade antimicrobiana com formação de 3 halos inibitórios, figura 3.

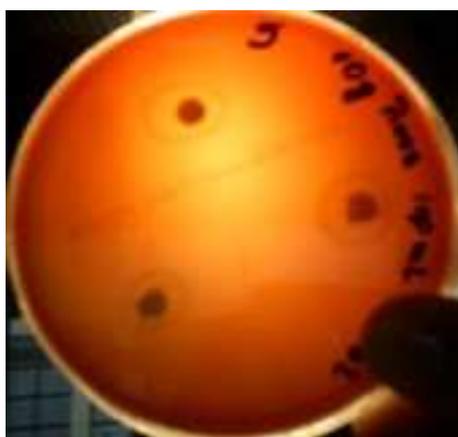


Figura 3– Halos de inibição formados pela atividade antimicrobiana do macerado alcoólico sobre o *streptococcus sp*

Quando comparado com o teste em branco (somente etanol) observou-se para o macerado hidroalcoólico apenas dois halos de inibição o

que associa a atividade antimicrobiana à ação sinérgica do álcool e do óleo, figura 4.



Figura 4 – Halos de inibição formados pela atividade antimicrobiana do macerado hidroalcolico sobre o streptococcus sp.

Para o macerado hidrolato a atividade antimicrobiana não foi evidenciada sobre a bactéria streptococcus sp, com ausência de formação de halos de inibição, figura 5.



Figura 5 – Ausência da formação de halos de inibição nos discos embebidos de macerado hidrolato sobre o streptococcus sp.

Para os extratos aquosos, o infuso e o decocto, não observou-se a formação de halos de inibição, o que pode ter ocorrido devido ao fato do extrato aquoso de *Pinus Pinaster* estar muito diluído mascarando de certa forma a ação antimicrobiana do óleo sobre o *Streptococcus sp*, figura 6 e figura 7 respectivamente:



Figura 6– Ausência da formação de halos de inibição nos discos embebidos de infuso sobre streptococcus sp., figura

7– Ausência da formação de halos de inibição nos discos embebidos de decocto sobre streptococcus sp.

Pode-se observar que não houve formação de halo inibitório em torno dos discos embebidos pelos extratos aquosos. Evidenciando a necessidade de concentrar os extratos aquosos para realização de novos testes da atividade antimicrobiana em diferentes concentrações.

Conclusões

Os resultados obtidos comprovaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial sobre a bactéria do tipo *Streptococcus sp.* Etapas a serem concluídas: Estudo de diferentes concentrações do óleo sobre a bactéria; Preparo de extratos em diferentes concentrações; Estudo de melhor adequação de métodos de extração de óleo essencial de *Pinus Pinaster* para um rendimento apreciável; Avaliação da composição química, para confirmação dos constituintes químicos através de técnicas de isolamento e caracterização.

Agradecimentos

Unics – Laboratório de Microbiologia

Referências

- Angnes, A. I. S. Isolamento, caracterização química e avaliação da propriedade inseticida do óleo essencial de piper amplum. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional de Blumenau. 2005
- Bandoni, Arnaldo. Especialização em óleos essenciais: aspectos básicos de um projeto industrial para extração de óleos essenciais pelo método arraste a vapor. 2. ed. Porto Alegre: PUCRS, 2003.

Rauber, S. C. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 37, nº1, jan./abr., 2001.

Reznicek G; Zitterl-Eglseer K. 2003. Quantitative determination of the faradiol esters in marigold flowers and extracts. *Scientia Pharmaceutica*, 71: 121-128.

Trabulsi, R. L; Alterthum, F. Microbiologia 4ª edição – São Paulo – Editora Atheneu, 2005 pgs 117-223.

Simões, C.M. de O.; Spitzer, V. Óleos essenciais. In: Simões, C.M. de O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P. de; Mentz, L.A.; PETROVICK, P. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da UFSC, 1999. p.397-425.