



Concentração do extrato pirolenhoso de *Eucalyptus urograndis* (clone I144), sua viabilidade e ação antimicrobiana

Gil Sander Próspero Gama^{1*}, Gabriel Siqueira de Andrade¹, Wendy Mattos Andrade Teixeira de Souza¹,
Fernanda Yasmin Garcia de Faria¹, Francisco Marlon Carneiro Feijó¹, Alexandre Santos Pimenta¹

RESUMO: Extrato pirolenhoso (EP) é amplamente investigado como agente antimicrobiano. No entanto, a elevada porcentagem de água em sua constituição pode acarretar em dificuldades de utilização. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficiência do método de concentração por evaporação do EP de *E. urograndis*, a influência desse processo na sua atividade antimicrobiana e a sua viabilidade por seis meses. O EP foi concentrado (EPC) por evaporação em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C por aproximadamente 28h. Posteriormente foram realizadas análises microbiológicas de Concentrações Inibitória, Bactericida e Fungicida Mínimas (CIM, CBM e CFM, respectivamente) e de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os resultados demonstraram eficiência do processo de concentração. Após esse processo, o EPC teve sua ação antimicrobiana potencializada, demonstrando a exigência de concentrações menores para resultar em inibição, quando comparado ao EP não submetido à concentração. Essa eficiência permaneceu mesmo após 6 meses de avaliações. Conclui-se que o processo de concentração é eficiente para reduzir a água do EP, não interfere negativamente em sua ação antimicrobiana e o que EPC permaneceu viável durante todo o tempo de avaliação.

Palavras-chave: ácido pirolenhoso, redução do volume de água, antimicrobiano natural, MEV

Concentration of the pyroligneous extract of *Eucalyptus urograndis* (clone I144), its viability and antimicrobial action

ABSTRACT: Pyroligneous extract (PE) is widely investigated as an antimicrobial agent. However, the high percentage of water in its composition can lead to difficulties in use. Thus, the objective of this research was to evaluate the efficiency of the method of concentration by evaporation of EP from *E. urograndis*, the influence of this process on its antimicrobial activity and its viability for six months. The EP was concentrated (CPE) by evaporation in a forced air circulation oven at 60 °C for approximately 28h. Subsequently, microbiological analyzes of Minimum Inhibitory, Bactericidal and Fungicide Concentrations (MIC, MBC and MFC, respectively) and Scanning Electron Microscopy (SEM) were carried out. The results demonstrated the efficiency of the concentration process. After this process, EPC had its antimicrobial action enhanced, demonstrating the requirement for lower concentrations to result in inhibition, when compared to EP not subjected to concentration. This efficiency remained even after 6 months of evaluations. It is concluded that the concentration process is efficient in reducing water from EP, does not negatively interfere with its antimicrobial action and that EPC remained viable throughout the evaluation time.

Keywords: pyroligneous acid, water volume reduction, natural antimicrobial, SEM

INTRODUÇÃO

O extrato pirolenhoso (EP) é um produto oriundo da carbonização da madeira, originado da condensação dos vapores emitidos durante esse processo. Apresenta constituição química extremamente rica e variada (PIMENTA et al., 2018;). Devido a isso, vem sendo analisado como importante agente antimicrobiano natural (SOUZA et al., 2018).

No entanto, esse produto contém elevada concentração de água, cerca de 80 a 90%, em sua composição química (YATAGAI et al. 2002). Isso revela que a fração orgânica e bioativa do mesmo, em grande maioria, está contida em apenas cerca de 10 a 20% do seu total (HANCHAI et al. 2021).

Esse grande volume de água, além de não ser útil para a sua bioatividade, ainda acarreta em inconvenientes para sua utilização como, dificuldade de armazenamento e instabilidade. Assim, faz-se necessário estabelecer um método eficiente que diminua o excedente de água do produto sem interferir negativamente em sua ação antimicrobiana.

Testes microbiológicos como determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e das concentrações bactericida e fungicida mínimas (CBM e CFM) são importantes formas de avaliar a ação antimicrobiana de produtos (CLSI, 2012; GAMA et al., 2023). A microscopia eletrônica de

Recebido em 15/01/2024; Aceito para publicação em 22/05/2024

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte

*e-mail: gilsander.pgama@gmail.com

varredura (MEV) também é uma importante ferramenta de investigação, pois possibilita o registro de imagens dos microrganismos (BELHAOUARI et al., 2020). Isso permite avaliações morfológicas, antes e depois de tratamentos.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficiência do método de concentração por evaporação do EP de *E. urograndis*, a influência desse processo em sua atividade antimicrobiana e a sua viabilidade por um período de avaliação de seis meses.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação do extrato pirolenhoso concentrado (EPC)

A preparação do EP se deu conforme Gama et al. (2023), utilizando amostras de madeira de *Eucalyptus urograndis* – clone I144. Posteriormente, o EP foi concentrado (EPC) por evaporação em estufa de circulação forçada de ar (Sterilifer - SX cr/80) a 60 °C por aproximadamente 28 horas, objetivando redução de 90% de seu volume. Foram feitas 10 repetições.

Testes antimicrobianos: CIM, CBM, CFM

Para a CIM foram realizadas avaliações in vitro pelo método de microdiluição em caldo, com microplacas de 96 poços. Diluições do EPC foram feitas frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida albicans* - ATCC 10231, partindo-se de 15 até 0.937% (15, 7.5, 3.75, 1.875 e 0.937% de EPC). Para a CBM e CFM utilizou-se a semeadura em placas de Petri e posterior observação da menor concentração capaz de causar inativação total da formação de colônias de microrganismos. Os procedimentos metodológicos se deram conforme Gama et al. (2023) e Clinical And Laboratory Standards Institute - CLSI (2012).

Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a preparação dos inóculos e o processamento das amostras para leitura, utilizou-se

como base a metodologia empregada por Gama et al. (2023). Os inóculos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min para formação dos péletes microbianos. Posteriormente, as amostras passaram pelo processo de fixação, pós-fixação, secagem e, então, foram cobertas com ouro 9 nm e observadas em microscópio eletrônico de varredura a um ritmo de tensão acelerada de 30 KV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes antimicrobianos (CIM, CBM e CFM)

Os resultados obtidos demonstram que o processo de concentração do EPC não interferiu negativamente na sua ação antimicrobiana (Tabela 1). Além disso, os dados indicam que esse produto permaneceu com atividade antimicrobiana ativa, mesmo após seis meses de armazenamento (Tabela 1). Ao analisar o estudo de Gama et al. (2023), constatou-se que o processo de concentração do EPC potencializou sua ação antimicrobiana, exigindo valores menores do que os do produto não concentrado para resultar em inibição. Nesse estudo, os valores de CIM revelaram que foram necessários 6.25 e 12.5% de EP (da mesma espécie aqui investigada) para inibir *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente. Em contrapartida, na presente pesquisa os valores foram de 1.87 e 3.75% para os mesmos microrganismos, respectivamente. A ação antimicrobiana que esse produto desempenhou indica que, mesmo após o processamento para concentração, importantes compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos e compostos fenólicos, permaneceram em sua constituição (PIMENTA et al., 2018). Quanto a sua potencialização, produtos orgânicos, quando processados, podem sofrer modificações químicas de modo que alguns constituintes podem aumentar, diminuir, surgir e, até mesmo, desaparecer (WEN et al. 2012). Essa possível mudança química pode explicar sua maior eficiência antimicrobiana.

Tabela 1. CIM, CBM e CFM para os microrganismos expostos à ação do extrato pirolenhoso concentrado (EPC) de *E. urograndis* após a concentração (1° mês) e depois de seis meses de armazenamento (6° mês).

Microrganismos	Concentração de EPC (%)			
	1° mês		6° mês	
	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.87	3.75	1.87	3.75
<i>Candida albicans</i> *	3.75	7.50	3.75	3.75

Onde: EPC – extrato pirolenhoso concentrado; CIM – concentração inibitória mínima; CBM – concentração bactericida mínima; CFM – concentração fungicida mínima; * – em lugar de CBM deve-se usar CFM.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de MEV demonstram diferenças significativas na estrutura morfológica das células microbianas testadas (Figura 1).

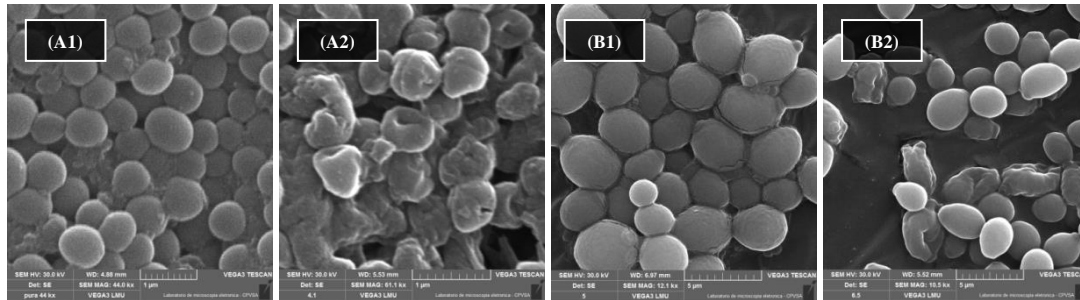


Figura 1 - Micrografias obtidas antes e depois da exposição de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* ao extrato pirolenhoso concentrado (EPC) de *Eucalyptus urograndis*. (A) – *S. aureus* com ampliação de 40.000 e 60.000 x; (B) – *C. albicans* com ampliação de 12.000 e 10.000 x. Figuras representadas por: 1 - microrganismos antes da exposição ao EPC; 2 - após exposição de 24 h ao EPC.

Foram utilizados dois grupos de células: o controle (não submetido ao tratamento) e o tratado com EPC, objetivando estabelecer comparações entre o padrão morfológico celular antes e depois da exposição ao antimicrobiano avaliado. As células microbianas sem (A1) (A2) (B1) (B2) tratamento são esféricas, lisas e túrgidas (Figura 1: A1 e B1). Após a exposição ao EPC, as mesmas se tornaram deformadas, enrugadas, irregulares e com aparentes perfurações (Figura 1: A2 e B2). Como mencionado, o EPC é rico em ácidos orgânicos e em compostos fenólicos (PIMENTA et al., 2018; GAMA et al., 2023). Logo, a sua ação antimicrobiana e a degradação celular observada nas imagens é atribuída à ação desses compostos, visto que eles são importantes agentes antimicrobianos (PEH et al., 2020; ALSHUNIABER et al. 2021).

Pesquisas revelam que o modo de ação dessas substâncias está relacionado com a destruição da membrana e da parede celular. Compostos fenólicos podem afinar a espessura da parede celular e dispersar ribossomos (ALSHUNIABER et al., 2021). Além disso, causam perda da integridade da membrana, seu descolamento e vazamento do citoplasma (ALBANO et al., 2016). Já ácidos orgânicos, não dissociados, podem penetrar a célula microbiana, se dissociarem e causar a ruptura celular, devido a acidificação do seu pH (WANG et al., 2014).

CONCLUSÕES

Conclui-se que o processo de concentração do EP, por evaporação, é eficiente para a redução da água do produto e não interfere negativamente em sua ação antimicrobiana. Essa ação foi potencializada após a concentração do produto, quando comparado ao EP não submetido à concentração. O EPC permaneceu viável pelos seis meses de avaliação. Estudos posteriores são

necessários para definir com maior precisão as modificações que podem ter acontecido no produto após a submissão à concentração.

AGRADECIMENTO

O presente trabalho de investigação teve colaboração da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- ALBANO, M., ALVES, F., ANDRADE, B., BARBOSA, L., PEREIRA, A., CUNHA, M., RALL, V., FERNANDES JÚNIOR, A. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, v.38, p.83-90, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.003>.
- ALSHUNIABER, M. A., KRISHNAMOORTHY, R., ALQHTANI, W. H. Antimicrobial activity of polyphenolic compounds from Spirulina against food-borne bacterial pathogens. *Saudi J. Bio. Sci.*, v.28, p.459-464, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.029>.
- BELHAOUARI, D., FONTANINI, A., BAUDOIN, J., HADDAD, G., BIDEAU, M., KHALIL, J., RAOULT, D., SCOLA, B. The strengths of scanning electron microscopy in deciphering SARSCoV-2 infectious cycle. *Front. Microbiol.*, v.11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02014>.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard- Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: CLSI, 2012.

- GAMA, G. S. P., PIMENTA, A. S., FEIJÓ, F., SANTOS, C., FERNANDES, B., OLIVEIRA, M., SOUZA, E., MONTEIRO, T., FASCIOTTI, M., AZEVEDO, T. Antimicrobial activity and chemical profile of wood vinegar from eucalyptus (*E. urophylla* x *E. grandis* - clone I144) and bamboo (*Bambusa vulgaris*). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.39, n.186, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03628-x>.
- HANCHAI, K.; TRAIRATAPIWAN, T., LERTPATARAKOMOL, R. Drinking water supplemented with wood vinegar on growth performance, intestinal morphology, and gut microbial of broiler chickens. *Vet. World*, v.14, n.1, p.92-96, 2021. Disponível em: www.doi.org/10.14202/vetworld.2021.92-96.
- PEH, E., KITTLER, S., REICH, F. Antimicrobial activity of organic acids against *Campylobacter* spp. development of combinations—A synergistic effect?. *Plosone*, v.15, n.9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239312>.
- PIMENTA, A.S.; FASCIOTTI, M.; MONTEIRO, T.; LIMA, K. Chemical composition of pyroligneous acid obtained from eucalyptus GG100 clone. *Molecules*, v. 23, n. 2, p. 426, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23020426>.
- SOUZA, J. L. S., GUIMARÃES, V. B. S., CAMPOS, A. D., LUND, R. Antimicrobial potential of pyroligneous extracts – a systematic review and technological prospecting. *Braz. J. Microbiol.*, v.49, n.1, p.128-139, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.07.001>.
- WANG, Y., DAI, A., HUANG, S., KUO, S., SHU, M., TAPIA, C., YU, J., TWO, A., ZHANG, H., GALLO, R., HUANG, C. Propionic acid and its esterified derivative suppress the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA30. *Benef. Microbes*, v.5, n.2, 161-168, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/BM2013.0031>.
- WEN, J. X., ZHAO, D., DENG, J. Influence of processing methods on the chemical composition of the essential oil from *A. lappa*. *Zhong Yao Cai*, v.35, n.9, p.1397-1401, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23451492/>.
- YATAGAI, M., NISHIMOTO, M., HORI, K., OHIRA, T. Termiticidal activity of wood vinegar, its components and their homologues. *J Wood Sci*, n.4, p.338-342, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00831357>.