



BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO MONOTERPENO (S)-(-)-CITRONELAL CONTRA CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

Joyce Natielle Miranda Cvalcante¹; Daniele de Sousa Siqueira¹; Abrahão Alves de
Oliveira Filho²;

¹ Acadêmicas do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) –
Campus Patos/PB.

E-mail: joyce_natielle@hotmail.com

E-mail: danieleodonto13@gmail.com

² Professor Adjunto do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande
(UFCG) – Campus Patos/PB.

E-mail: abrahão.farm@gmail.com

Resumo: Os conhecimentos acerca das plantas medicinais e da sua utilização têm vindo a ser acumuladas desde a antiguidade até aos nossos dias. Os óleos essenciais são misturas naturais muito complexas de diversas classes de substâncias, dentre elas os fenilpropanóides, mono e sesquiterpenos que podem ser extraídos a partir das plantas aromáticas. As denominações dadas a estes óleos são devidas às suas características físico-químicas. São considerados óleos por serem, geralmente, líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, por apresentarem volatilidade, possuem aroma agradável e intenso da maioria de seus grupos representantes. Geralmente, os componentes principais dos óleos essenciais determinam as suas propriedades, as quais devem ser estudadas de modo a investigar novas possibilidades de utilização. Neste contexto, destaca-se o monoterpene Citronelal, um produto do metabolismo secundário das plantas. Estudos com os derivados químicos do Citronelal e Citronelol, ambos isolados do óleo de citronela, demonstraram boa atividade alelopática, antioxidante, herbicida, antifúngica e antimicrobiana. Desta forma, o principal objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antibacteriana do (S)-(-)-Citronelal contra cepas de *Escherichia coli*. Para isto, utilizou-se o método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração bactericida mínima (CBM). Para a realização dos ensaios farmacológicos, as substâncias foram solubilizadas em DMSO e diluídas em água destilada. Na presente pesquisa, observou-se que o monoterpene em estudo apresentou CBM 50% de 1024 µg/mL e CIM 50% de 256 µg/mL. Com base nesses resultados pode-se afirmar que o (S)-(-)-Citronelal possui forte efeito antibacteriano frente às cepas de *E. coli*.

Palavras-chave: Monoterpenos, (S)-(-)-Citronelal, *Escherichia coli*.

1. Introdução

As plantas com propriedades terapêuticas utilizadas no cuidado de saúde tradicional constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. Elas aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo ao longo de décadas e têm despertado o interesse de vários pesquisadores (CEBALLOS et al., 1993; LIMA, 1996; CUNHA, 1995; COWAN, 1999; FARIAS; Lima, 2000; BELÉM, 2002;



MICHELIN et al., 2005)

Óleos essenciais são produtos resultantes do metabolismo secundário das plantas, podendo ser extraídos por todos os órgãos, como brotos, folhas, flores, caules, galhos, raízes e sementes e são armazenados em células secretoras, epidérmicas e tricomas. Devido a sua rica composição química, dentre os principais são: terpenoides, alcaloides e cumarinas. Os óleos essenciais tem ganhado cada vez mais notoriedade e despertado interesse, dentre pesquisadores do mundo todo, devido as suas inúmeras propriedades (RESCHKE; MARQUES; MAYWORM, 2007; BAKALLI, 2008).

Representante de uma classe de metabólitos secundários, os monoterpenos são os constituintes de óleos essenciais presentes em espécies de plantas aromáticas. Sua origem Biosintética deriva de unidades isoprenica, as quais são constituídas por dez unidades de carbonos (LAS HERAS et al., 2003, p.171; SOUZA et al.,2014).

A utilização de produtos naturais como agentes de controle microbiano não atrai somente a área de alimentos, por prevenir sua contaminação e deterioração, mas também a área farmacêutica, uma vez que patógenos associados a doenças infecciosas estão se tornando resistentes às drogas utilizadas. Nesse sentido, a ampla atividade biológica dos óleos essenciais tem levado à avaliação de óleos de distintas plantas; porém, poucos trabalhos mostram a atividade antimicrobiana de compostos isolados. Sabe-se que os óleos essenciais e alguns terpenos atuam sobre a membrana celular microbiana, provocando alterações que levam à perda de componentes celulares. Esta desestruturação da membrana tem sido atribuída às características lipofílicas dos terpenos. Por outro lado, este mecanismo não explica a grande diferença observada na atividade antimicrobiana de diferentes óleos com composição semelhante ou com componentes majoritários de estrutura similar (TOSCAN, 2010).

O Citronelal também pertencente ao grupo dos álcoois monoterpenoides e é o principal componente nas misturas de compostos químicos terpenoides, dando ao óleo de citronela o seu aroma característico de limão acentuado (JEONG-KYU et al.,2005). Sendo uma das substâncias majoritárias de óleos essenciais de plantas aromáticas (QUINTANS-JUNIOR et al., 2011), o Citronelal revelou ter inúmeras atividades, dentre elas, podemos exemplificar ação antimicrobiana (SEIXAS et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2011), alelopática (BRITO et al., 2012; TOMAZ et al., 2014), antioxidante (SCHERER et al.,2009; ANDRADE et al., 2012), herbicida (BRITO et al., 2012) e atividade inseticida e repelente (CHAGAS et al., 2002).



A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa na forma de bastonete e apresenta habitat no trato intestinal. Podem ser imóveis ou móveis por flagelos. A presença de fímbrias e de outras estruturas relacionadas desempenha um papel importante na virulência da bactéria. Alguns estudos mostram que em relação aos problemas causados por ela, destacam-se os principais alimentos como carnes mal cozinhadas, principalmente de origem bovina (hambúrgueres), enchidos curados, sementes de alface, sumos de fruta não pasteurizados, queijo curado e leite cru (QUALI, 2015).

O presente trabalho objetiva por meio de ensaios *in vitro* avaliar a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Bactericida Mínima do monoterpene (S)-(-)-Citronelal contra cepas de bactérias *E. coli*, para determinar a menor concentração do composto capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano.

2. Metodologia

2.1 Ensaios *in vitro*

2.1.1 Substâncias-teste

O monoterpene (S)-(-)-Citronelal foi adquirido da Indústria Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP). Para a realização dos ensaios farmacológicos, a substância foi solubilizada em DMSO e diluída em água destilada. A concentração de DMSO (dimetilsulfóxido) utilizada foi inferior a 0,1% v/v. O antimicrobiano utilizado na execução dos testes como controle positivo foi o cloranfenicol, adquirido da Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP).

2.1.2 Espécie Bacteriana e Meio de cultura

Serão utilizadas bactérias Gram-negativas sendo elas: *Escherichia coli* 2536, *Escherichia coli* ATCC 8539, *Escherichia coli* 101, *Escherichia coli* 102, *Escherichia coli* 103, previamente isoladas, identificadas e gentilmente cedidas pelo laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BioGer) do Departamento de Biologia Molecular (DBM), Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), coordenado pela Prof^a. Dr^a. Hilzeth de Luna Freire Pessôa.

Todas as cepas serão mantidas em meio Luria Bertani (LB) (constituído por: extrato de levedura (DIFCO) 10 g, tripton (DIFCO) 5 g, NaCl (VETEC) 10 g) a uma temperatura de 4 °C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em LB incubados



a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana será utilizado um inóculo bacteriano de aproximadamente $1 - 5 \times 10^8$ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000).

2.1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima dos monoterpenos foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000). Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido LB duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão do monoterpeno na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo de aproximadamente $1-5 \times 10^8$ UFC/mL da espécie bacteriana nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa de bactéria, especificamente.

Paralelamente, foi realizado o mesmo ensaio com o antibacteriano cloranfenicol nas concentrações de 1024 µg/mL a 4 µg/mL. Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo LB duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão, no caso o DMSO, foi feito um controle no qual serão colocados nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, 100 µL de DMSO e 10µL da suspensão bacteriana. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do LB em um orifício sem a suspensão das bactérias.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48hrs para ser realizada a leitura. A CIM para o monoterpeno e o antibacteriano será definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.1.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima (CBM) do monoterpeno também foi determinada para as cepas de bactérias. Após a leitura da CIM em 48 horas, alíquotas de 20



μL foram retiradas de cada poço da placa de microtitulação que não apresentaram crescimento bacteriano, e transferidas para poços de uma nova placa de microtitulação contendo 100 μL de LB, desprovidas de qualquer antimicrobiano. As placas inoculadas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C, e as CBMs serão registradas após 48 h. A CBM será definida como a menor concentração do monoterpeno que resultou em inibição visível do crescimento do micro-organismo (ERNST et al., 2002; PEREIRA et al., 2011).

3. Resultados e discussão

3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido

Os resultados referentes à sensibilidade das cepas bacterianas frente à ação do (S)-(-)-Citronelal são mostrados na tabela abaixo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido foi testada determinada para o monoterpeno (S)-(-)-Citronelal nas diferentes concentrações sugeridas na metodologia e determinada pela menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano. Observa-se que os resultados para o teste variaram entre 512 e 128 $\mu\text{g/mL}$, com CIM 50% igual a 256 $\mu\text{g/mL}$.

A menor CIM do (S)-(-)-Citronelal, foi 128 $\mu\text{g/mL}$, para as cepas *Escherichia coli* ATCC 2536 e ATCC 8539. As cepas *Escherichia coli* 101 e 102 apresentaram padrão igual de resposta frente aos compostos testados (256 $\mu\text{g/mL}$). O mesmo não ocorre com a *Escherichia coli* 103, na qual o composto apresenta uma Concentração Inibitória Mínima de 512 $\mu\text{g/mL}$.

3.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada a partir da menor concentração do monoterpeno que resultou em inibição visível do crescimento do microorganismo. Observa-se uma variação de 1024 a 256 $\mu\text{g/mL}$, com CBM 50% igual a 1024 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 1. Concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração bactericida mínima (CBM) em $\mu\text{g/mL}$ do monoterpeno (S)-(-)-Citronelal contra diferentes cepas de *Escherichia coli*.

	(S)-(-)-Citronelal	
Microorganismo	CIM	CBM



<i>Escherichia coli</i> ATCC 2536	128	256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8539	128	512
<i>Escherichia coli</i> 101	256	1024
<i>Escherichia coli</i> 102	256	1024
<i>Escherichia coli</i> 103	512	-

* (-) = Sem atividade

O Citronelal (3,7-dimetil-oct-6-enal) é um monoterpeno, predominantemente formado pelo metabolismo secundário de plantas. É tipicamente isolado como uma mistura não-racêmica dos enantiômeros R e S por destilação com arraste de vapor ou extração por solventes (PYBUS & SELL, 1999). Aligiannis et al. (2001) sugerem que uma atividade antimicrobiana é classificada como forte quando, para óleos essenciais, possuem CIM de até 500 µg/-mL, moderada para CIM de 600 a 1500 µg/-mL e fraca para CIM acima de 1500 µg/-mL.

Sendo assim, de acordo com os resultados da CIM 50%, o (S)-(-)-Citronelal pode ser considerado um forte efeito antimicrobiano frente às cepas *Escherichia coli*.

Por sua vez, para um composto ser considerado bactericida ou bacteriostático a Concentração Bactericida Mínima (CBM) deve ser igual ou duas vezes mais que o CIM ou o CBM deve ser maior que duas vezes o CIM, respectivamente (HAMBURGER; CORDELL, 1987). Dessa forma, ao analisar o valor da CBM50 pode-se concluir que para as cepas de *Escherichia coli* composto (S)-(-)-Citronelal se comportou como bactericida.

4. Conclusão

Portanto, com base nos resultados obtidos pode-se perceber que o monoterpeno (S)-(-)-Citronelal apresenta um forte efeito antibacteriano contra cepas de *E.coli*, com característica bactericida. Desta forma, sugere-se que este composto pode ser utilizado como uma alternativa terapêutica para o combate de infecções causadas por essas bactérias Gram-negativas.



Referências

- CARNEIRO, Joara Nalyda Pereira, et al. "Avaliação da atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal." *Cadernos de Cultura e Ciência* **13.2** (2015): p. 29-36.
- CAVALCANTI, Yuri Wanderley et al. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre microrganismos do canal radicular. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 40, n. 5, p. 208-214, 2011.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.
- CLOETE, T. E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compunds. **Int Biodeter Biodegradation**, v. 51, p. 277-282, 2003.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA-JR, J. P.; LIMA, E. O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in ethicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, P. 467–471, 2010.
- COX, S. D. The mode of antimicrobial action of essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170-175, 2000.
- CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four Monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for Their antibacterial activity. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.55, p. 6300–6308, 2007.
- GOLD, H. S.; MOELLERING R.C. Antimicrobial-drug resistance. **N Eng J Med.**, v. 335, n. 19, p. 1445-1453, 1996.
- GONZÁLEZ, M. J.; MARIOLI, J. M. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 104, p. 209-213, 2010.
- GUSTAFSON, J. E. Effects of tea tree oils on *Escherichia coli*. **Lett Appl Microbiol.**, v. 26, p. 194-198, 1998.
- MARCIEL, M. A. M., et al. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Cad. Prospecção, Salvador, vol. 8, n. 3, p. 478-487, jul./set. 2015.
- MILLEZI, A. F. et al. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev.**



bras. plantas med, v. 16, n. 1, p. 18-24, 2014.

MILLEZI, A. F., et al. "Essential oil characterization and its antibacterial activity from culinary and medicinal plants against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*." *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 15.3 (2013): 373-379.

NASCIMENTO, Adenilde Ribeiro, et al. "Efeito inibitório do óleo essencial do *Eucalyptus* sp., puro e associado a antibióticos, frente a cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* isoladas de manipuladores, alimentos, areia e água do mar." *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* 28.1 (2010).

OLIVEIRA, RAG de, et al. "Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica." *Rev Bras Farmacogn* 16.1 (2006): p. 77-82.

PASKOVATY, A.; PFLOMM, J. M.; MYKE, N.; SEO, S. K. A multidisciplinary approach to antimicrobial stewardship: evolution into the 21st century. **Int J Antimicrob Agents**, v. 25, p. 1-10, 2005.

PITOUT, J. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v.10, n.10, p.1165-1176, 2012;

QUALI. Bactéria Patogénica - *Escherichia coli*. 2015. Disponível em: <<http://www.quali.pt/microbiologia/478-escherichia-coli>>. Acesso em: 26 jan. 2017.