

# ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO D-LIMONENO SIMPLES E COMPLEXADO COM A $\beta$ -CICLODEXTRINA E EM AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MODULADOR ASSOCIADO COM DIFERENTES CLASSES DE ANTIBIÓTICOS

Iara Santos de Souza (1); Cesar Evangelista Duarte Filho (1); Maria do Socorro Costa (2); Rosângela Targino Pereira (3); Micheline Azevedo de Lima (4)

*Universidade Federal da Paraíba*

**Resumo:** A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema de preocupação crescente, onde diversas pesquisas têm-se proposto a buscar por novos agentes com propriedades antibacterianas, dentre estas, os produtos naturais fornecem uma fonte bastante promissora. O d-limoneno monoterpeneo descrito na literatura por apresentar várias bioatividades dentre estas atividades antibacteriana. A  $\beta$ -ciclodextrina é um oligossacarídeo citado para melhorar permeabilidade e estabilidade química de diversos composto e dos quais tem sido estudada para formar complexo de inclusão. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana d-limoneno, tanto na sua forma simples quanto complexado com a  $\beta$ -ciclodextrina frente às bactérias padrões e multirresistentes em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e avaliar sua interação com os antibióticos: gentamicina, imipeném e norfloxacino. A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, obtendo-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), e a após a média da concentração subinibitória mínima (CIM/8) associado com os antibióticos. O d-limoneno apresentou CIM de 256  $\mu\text{g/mL}$  frente *S. aureus* padrão e de 512  $\mu\text{g/mL}$  para *P. aeruginosa* multirresistente. Na atividade modificadora da ação antibiótica em associação com gentamicina o d-limoneno apresentou sinergismo frente à bactéria *S. aureus* e *E. coli*. Desta forma o d-limoneno demonstrou atividade antibacteriana clinicamente relevante, tanto para cepa Gram positiva quanto para uma Gram negativa e efeito sinérgico quando associado à gentamicina. Esses resultados mostram-se promissores, entretanto novos estudos são necessários para uma melhor elucidação do seu mecanismo de ação.

**Palavras-chave:** Resistência bacteriana, Monoterpenos, Efeito sinergismos.

## Introdução

A resistência aos antibióticos tem aumentando consideravelmente nos últimos anos, e o seu mau uso favoreceu a seleção de bactérias multirresistentes (MDR), conseqüentemente dificultando a ação do tratamento e aumento do seu custo (COUTINHO et al., 2015a).

Inúmeras pesquisas científicas têm-se destinado a procura por novos agentes com potencial antibacteriano. Produtos naturais, principalmente de origem vegetal são investigados na tentativa de descobrir propriedades farmacológicas a fim de combater microrganismos patogênicos (MATIAS et al., 2012).

Os óleos essenciais de plantas medicinais possuem em sua composição um conjunto de compostos químicos, principalmente dos terpenos, estes compostos podem agir individual, aditiva ou sinergicamente para melhorar a eficácia terapêutica de outras drogas, servindo assim de moléculas protótipos para estudos farmacológicos (COUTINHO et al., 2015b).

Compostos isolados a partir de produtos naturais podem apresentar atividade antibacteriana ou melhorar a eficácia dos antibióticos, aumentando o seu mecanismo de ação e dificultando a adaptação dos microorganismos (TEIXEIRA, 2009). Sendo seu estudo importante para compreender o seu mecanismo de ação farmacológica e toxicidade, incluindo efeitos clínicos benéficos para a saúde humana, assim também como fornece informações para confirmação do seu efeito terapêutico (ALMEIDA et al., 2011).

O d-limoneno é um monoterpene encontrado na maioria dos óleos essenciais de espécies aromáticas, sendo bastante citado na literatura quanto às suas bioatividades, dentre elas atividade antimicrobiana (SCHUCK et al., 2001; VIEGAS-JUNIOR, 2003; FALCÃO e MENEZES, 2003; PASSOS et al., 2009; DUARTE et al., 2005;). Também tem sido utilizado na fabricação de vários produtos, como cosméticos, aromatizantes, entre outros (FERRARINI et al., 2008).

As ciclodextrinas (CDS) são oligossacarídeos com estrutura de cone truncado sintetizados a partir da degradação do amido da enzima glicosiltransferase. Possui uma estrutura tridimensional com uma cavidade hidrofóbica central e uma superfície exterior hidrofílica. Esta conformidade permite encapsular substratos para formar complexo de inclusão (JUNIOR et al., 2015; XIE et al., 2015). A inclusão de substâncias com CDs tem sido bastante estudada para melhorar a segurança e eficácia de produtos, uma vez que pode aumentar a solubilidade, permeabilidade e estabilidade química de diversos compostos como óleos essenciais, medicamentos e produtos voláteis (JUNIOR et al., 2015). A  $\beta$ -CD é mais utilizada em indústria farmacêutica, por ser de fácil acesso e baixo custo, além de possuir capacidade de interagir com a maioria das moléculas do interesse farmacêutico (FREITAS, 2017; SILVA, 2015).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do composto d-limoneno, tanto em sua forma simples quanto complexada com a  $\beta$ -CD e avaliar a atividade moduladora com diferentes classes de antibióticos.

## **2 Materiais e Métodos**

### *2.1 Compostos utilizados*

O composto d- limoneno foi cedido pelo Laboratório de Farmacologia e Química Molecular – LFQM da Universidade Regional do Cariri – URCA. A  $\beta$ -ciclodextrina foi adquirida junto à empresa Sigma-Aldrich® (EUA) e o complexo do d- limoneno/ $\beta$ -ciclodextrina foi preparado no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe – UFS.

## 2.2 Meios de Cultura

Os meios de culturas utilizados foram: Heart Infusion Agar - HIA (Difco Laboratories Ltda.) que foi preparado segundo a especificação do fabricante e o meio de cultura em caldo Brain Heart Infusion Broth– BHI (Acumedia Manufacturers Inc.) foi preparado na concentração de 10%.

## 2.3 Drogas e Reagentes

Os antibióticos utilizados no teste foram gentamicina, norfloxacino e Imipeném (Sigma Co., St. Louis, USA). Os antibióticos foram dissolvidos em água destilada e estéril na concentração de 1.024  $\mu\text{g/mL}$ . Quanto aos compostos utilizados foram pesados 10 mg que foram posteriormente dissolvidas em 1 mL de dimetilsulfóxido-DMSO e em água destilada e estéril até concentração de 1.024  $\mu\text{g/mL}$ .

Para leitura dos testes foi utilizado o reagente resazurina sódica (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) como um indicador colorimétrico do crescimento bacteriano por óxido-redução (SALES et al., 2014; SALVAT et al., 2001).

## 2.4 Cepas Microbianas

Os microorganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM da Universidade Regional do Cariri - URCA. Foram utilizadas as seguintes linhagens padrões: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; e as linhagens multirresistentes: *E. coli* 06, *S. aureus* 10, *P. aeruginosa* 24.

## 2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima- CIM

A determinação da concentração inibitória mínima- CIM foi realizada pelo o método de microdiluição em caldo adaptado de Javdpour et al (1996). Para os procedimentos foram preparados inóculos a partir das culturas do crescimento de 24 horas. Uma alçada das cepas foram suspensas em solução salina a 0,9% e comparada com a turvação da escala 0,5 de McFarland ( $1 \times 10^5$  UFC/mL).

Foram preparados tubos de eppendorfs® com volume de 1,5 mL da solução, 10% foram correspondentes ao inóculo bacteriano e o restante da solução foi completado com meio de cultura BHI a 10% (1350 µL). Posteriormente 100 µL foram adicionados em placa de microdiluição de 96 poços. Logo após foi feita a microdiluição seriada de 1:1 até a penúltima cavidade, sendo o último poço utilizado para o controle do crescimento microbiano. As concentrações variaram de 512 a 0,5 µg/mL. Logo após as placas foram levadas à estufa de crescimento microbiano por 24 horas a 37 °C.

Para a leitura da CIM foi utilizado 20 µL da solução de resazurina e observado através da mudança de coloração a reação da óxido-redução em temperatura ambiente num período de 2 horas. A mudança de coloração do azul para rosa é evidenciada como crescimento bacteriano (SALES et al., 2014; SALVAT et al., 2001). Os procedimentos foram realizados em triplicata e avaliados como média geométrica.

## *2.6 Efeito Modulador dos Compostos na Atividade de Antibióticos de Uso Clínico*

Para examinar se os compostos modificariam a ação dos antibióticos frente às bactérias multirresistente, foram utilizados o método proposto por Coutinho et al., (2008a). Os compostos utilizados foram avaliados em concentração sub-inibitória mínima (CIM/8) para que não houvesse a inibição do crescimento por ação direta.

Para os procedimentos, foram preparados tubos de eppendorf® com o volume de 1.500 µL da solução, sendo 10 % foram correspondentes ao inóculo bacteriano (150 µL) e a CIM/8 µL dos compostos utilizados. Para o controle da modulação foram utilizados tubos eppendorf® com 1.350 µL de BHI, 150 µL de suspensão bacteriana. Logo em seguida, foram preenchidas as placas de microdiluição com 100 µL da solução. Posteriormente foram feita microdiluição com 100 µL dos antibióticos numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade, o ultimo poço foi utilizado para o controle do crescimento microbiano. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e a leitura realizada através da resazurina.

## *2.7 Análise Estatística*

Os resultados bacterianos foram analisados usando a média geométrica de acordo com ANOVA. ( $P < 0,05$  é considerado significativo).

## **3 Resultados e discussão**

### *3.1 Atividade Antimicrobiana*

A partir dos resultados foi observado que a CIM da maioria das substâncias foram iguais ou maiores a 1024 µg/mL, tanto para as bactérias padrões quanto para as multirresistentes, com exceção do d-limoneno isolado que teve a CIM de 256 µg/mL para uma bactéria padrão Gram-positiva (S.A ATCC 25923) e para uma bactéria multirresistente Gram-negativa (PA 24) com CIM de 512 µg/mL. Esses resultados estão de acordo com a literatura sobre o efeito antibacteriana do limoneno (VUUREN & VILJOEN, 2007; AYOOLA et al., 2008; WANG et al., 2012; OBIDI et al., 2013; CIRINO, 2014).

A menor CIM foi vista para a bactéria S.A ATCC 25923 corroborando com outros trabalhos sobre a atividade antibacteriana de extratos, óleos e substâncias isolada do gênero *Citrus*, onde o composto limoneno é largamente encontrado, os quais demonstram possuir um melhor efeito sobre as bactérias Gram-positivas do que sobre Gram-negativas. Isso é devido à diferença da estrutura da parede e membrana celular que faz com que as Gram-positivas sejam mais sensíveis aos componentes dos óleos essenciais (WANG et al., 2012 e OBIDI et al., 2013; AYOOLA et al., 2008). A natureza da membrana celular das Gram-negativas restringem a absorção de moléculas e seu movimento para dentro das células através dos canais de porinas (TORTORA, 2012).

Além dos efeitos comuns dos terpenos sobre a cepa Gram-positiva, o d-limoneno também teve atividade antibacteriana para Gram-negativa, provavelmente devida sua característica lipofílica que funciona com um efeito tóxico na estrutura e função da membrana bacteriana, resultando no aumento de fluidez e permeabilidade da membrana, desordenando as proteínas e ocasionando a perda de função (VALERIANO et al., 2012).

Embora a β-ciclodextrina tenha sido citada por aumentar a solubilidade, permeabilidade e melhorar a aderência a parede celular bacteriana (JUNIOR et al., 2015; TEIXEIRA, 2008), a β-ciclodextrina e o complexo não apresentaram atividade antimicrobiana direta sobre as cepas testadas. Resultados similares foram encontrados em Sousa et al. (2017) e Andrade et al. (2017) envolvendo atividade antimicrobiana da β-ciclodextrina para estas cepas.

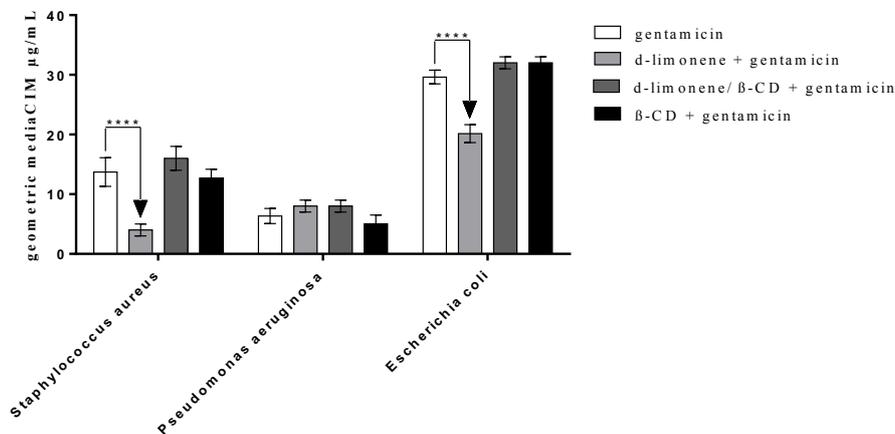
Em trabalhos de Andrade et al. (2017) envolvendo o complexo inclusão com β-ciclodextrina também foram relatados a falta de atividade antimicrobiana, o que corrobora com esses resultados. A complexação resulta em mudanças estruturais e propriedades físico-químicas diferentes, o que justifica os resultados distintos envolvendo o complexo (ANDRADE et al., 2017; SOUSA, 2017).

### 3.2 Efeito modulador de antibiótico

Estudos com a combinação de drogas e produtos naturais vêm sendo uma prática bastante utilizada na tentativa de reverter à resistência aos antibióticos, podendo dessa forma aumentar a atividade do mesmo ou reverter o quadro de resistência (COUTINHO et al., 2015a).

O efeito modulatório das substâncias foi testado em associação com os antibióticos: gentamicina, norfloxacino e imipeném com o objetivo de avaliar uma possível interação entre eles e os compostos d-limoneno, o complexo d-limoneno/ $\beta$ -CD e  $\beta$ -CD, buscando desta forma, observar se existiria atividade sinérgica ou antagônica, ou seja, se as substâncias em associação melhorariam a ação antibiótica (CANTON & ONOFRE, 2010).

**Figura 1:** Modulação bacteriana com o antibiótico gentamicina



**Legenda:** Efeito modulador do d-limoneno,  $\beta$ -CD e complexo: d-limoneno;  $\beta$ -CD em associação com gentamicina contra *S. aureus* 10, *E. coli* 06 e *P. aeruginosa* 24.

\*\*\*\* valor estatisticamente significativo com  $p < 0,0001$ ; não estatisticamente significativo com  $p > 0,05$ .

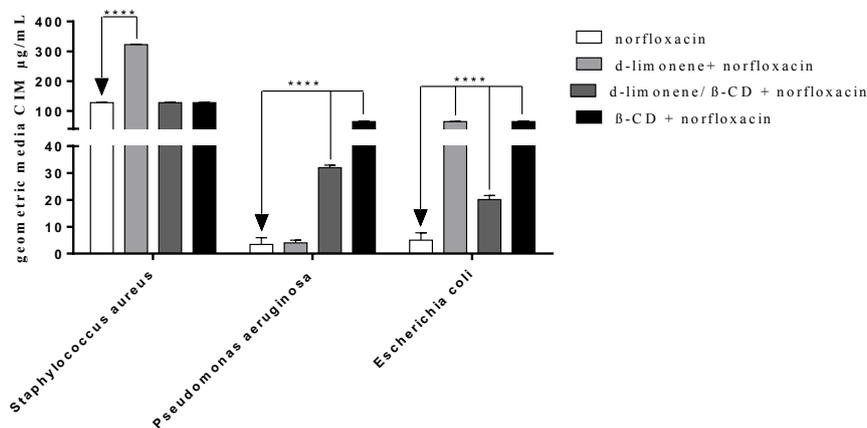
O d-limoneno demonstrou sinergismo frente a *S. aureus* 10, com a redução da CIM de 13,71  $\mu\text{g/mL}$  para 4  $\mu\text{g/mL}$  em associação com a gentamicina (figura 1). Este efeito pode ser devido ao caráter lipofílico dos terpenos que aumenta o influxo do antibiótico para dentro da célula por alteração na permeabilidade na membrana celular (MAIA, et al 2014; RIBEIRO, et al 2012). A característica lipofílica dos terpenos, como o d-limoneno, faz com que a membrana fique mais permeável aos prótons e íons devido ao desarranjo da estrutura, inclusive das proteínas de efluxo, que pode levar uma maior interação com as substâncias utilizada e ocasione a morte celular bacteriana (OLUWATUYI et al., 2004; CRISTANI et al., 2007).

A associação do d-limoneno com a gentamicina conseguiu reduzir a CIM de 30  $\mu\text{g/mL}$  para 20,1  $\mu\text{g/mL}$  (figura 1), ocasionando assim um efeito sinérgico. Os aminoglicosídeos têm como

função interagir na síntese protéica alterando conformação ribossomal bacteriano (JANA & DEB, 2006; TORTORA, 2012), sendo um dos prováveis mecanismos de resistência causado por *E.coli* é a inativação enzimática e o efluxo do antibiótico (COUTINHO et al., 2008b).

O complexo d-limoneno/ $\beta$ -CD, bem como a  $\beta$ -CD isolada, não demonstraram atividades sinérgicas quando comparadas ao controle. Porém, quando comparamos o d-limoneno complexado com o d-limoneno puro, notamos uma CIM mais baixa no composto puro (figura 1). Este efeito pode ser devido a mudanças estruturais no composto complexado, indicando que a complexação alterou na organização e na interação físico-químicas com o sistema celular, dentre estas, a forma de interação composto/antibiótico (ANDRADE, 2017; SILVA, 2015).

**Figura 2:** Modulação bacteriana com o antibiótico norfloxacino



**Legenda:** Efeito modulador do d-limoneno,  $\beta$ -CD e complexo: d-limoneno;  $\beta$ -CD em associação com norfloxacino contra *S. aureus* 10, *E. coli* 06 e *P. aeruginosa* 24.

\*\*\*\* valor estatisticamente significativo com  $p < 0,0001$ ; não estatisticamente significativo com  $p > 0,05$ .

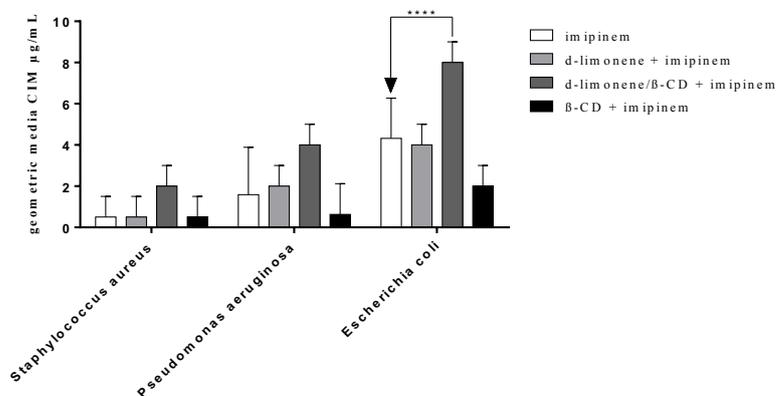
De acordo com os resultados mostrados na figura 2, a associação do d-limoneno com a norfloxacino para *S. aureus* 10 foi antagônica, ou seja, esta associação possibilitou um aumento da CIM. Cirino (2014) avaliou o d-limoneno para a linhagem de *S. aureus* 1199B em associação com o norfloxacino e esta apresentou resultados indiferente com relação ao controle, com ausência de sinergismo e antagonismo para a linhagem testada.

Em *E. coli* a combinação das substâncias associada com o norfloxacino foi antagônica, porém quando comparamos o d-limoneno isolado com o complexado observamos diminuição da CIM na substância complexada (figura 2). Entretanto, ao comparamos esta associação com o imipeném notamos um aumento na CIM na substância complexada (figura 3). O antagonismo das

substâncias em associação com os antibióticos pode ser explicado pela ligação dos compostos no local onde o antibiótico se ligaria ou a um possível mecanismo de quelação com o antibiótico, diminuindo o espectro de ação da droga (OLIVEIRA et al., 2017; COUTINHO et al., 2015a).

Para *P. aeruginosa* também em associação com o norfloxacino (figura 2) o resultado mostrou-se antagonístico tanto no complexo quanto na  $\beta$ -CD isolada, com aumento da CIM de 3,42  $\mu$ g/mL para 32 e 64  $\mu$ g/mL respectivamente, indicando que a  $\beta$ -CD não melhorou a atividade antibiótica, resultados similares foram encontrados em trabalhos de FREITAS et al., (2017) e OLIVEIRA et al., (2017).

**Figura 3:** Modulação bacteriana com o antibiótico Imipeném



**Legenda:** Efeito modulador do d-limoneno,  $\beta$ -CD e complexo: d-limoneno;  $\beta$ -CD em associação com Imipeném contra *S. aureus* 10, *E. coli* 06 e *P. aeruginosa* 24.

\*\*\*\* valor estatisticamente significativo com  $p < 0,0001$ ; não estatisticamente significativo com  $p > 0,05$ .

Na literatura existem outros trabalhos sobre o melhoramento da atividade antimicrobiana do d-limoneno, como por exemplo, a nanoemulsão com a nisina (ZHANG et al., 2014) e a nanoemulsão com  $\epsilon$ -polilisina (ZAHY et al., 2017), porém para o nosso conhecimento este é o primeiro trabalho que relata a atividade antimicrobiana do d-limoneno complexado com a  $\beta$ -ciclodextrina no melhoramento da atividade antibiótica.

#### 4 Conclusão

Baseado nos resultados pode-se observar que o d- limoneno apresentou atividade antibacteriana clinicamente relevante, tanto para as cepas Gram positivas quanto para a Gram negativa. O complexo d-limoneno/ $\beta$ -ciclodextrina e a  $\beta$ -ciclodextrina isolada não apresentaram atividade antibacteriana direta contra as cepas testadas. O d-limoneno apresentou efeito sinérgico quando associado à Gentamicina frente a *S. aureus* e *E. coli*. O efeito modulatório das substâncias em associação com norfloxacino e o imipeném na resistência bacteriana mostrou-se antagônicos ou insignificantes frente às cepas testadas. Os resultados mostrados neste estudo indicam a necessidade de estudos adicionais para uma melhor compreensão das bioatividades dos compostos, no que se refere à atividade antibacteriana e atividade modulatório com antibióticos.

#### Referências

- ALMEIDA, R. N. et al. Essential Oils and Their Constituents: Anticonvulsant Activity. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2726-2742, 2011.
- ANDRADE, Tatianny A. et al. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of Hyptis martiusii Benth essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 89, p. 201-207, 2017.
- AYOOLA, G. A. et al. Evaluation of the chemical constituents and the antimicrobial activity of the volatile oil of Citrus reticulata fruit (Tangerine fruit peel) from South West Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 13, 2008.
- CANTON, M.; ONOFRE, S. B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 20, n.3, 2010.
- CIRINO, Isis Caroline da Silva et al. Modulação da resistência a drogas por óleos essenciais em linhagens de Staphylococcus aureus. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa- PB, 2014.
- COUTINHO, H. DM. et al. A atividade anti-estafilocócica *in vitro* de Hyptis martiusii Benth contra estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 18, v. 1, p. 670-75, 2008a.

COUTINHO, Henrique DM et al. Avaliação comparativa da modulação de antibióticos, frente às cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. **Revista Ciencias de la Salud**, v. 13, n. 3, p. 345-354, 2015b.

COUTINHO, Henrique Douglas Melo et al. Atividade antimicrobiana in vitro de Geraniol e Cariofileno sobre *Staphylococcus aureus*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 1, p. 98-105, 2015a.

COUTINHO, H. DM. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008b.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.15, p. 6300-6308, 2007.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 97, v. 3, p. 305-311, 2005.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

FERRARINI, Stela Regina et al. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and  $\beta$ -amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary parasitology**, v. 157, n. 1, p. 149-153, 2008.

FREITAS, T.S. Atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Hyptis martiusii* benth e de seu complexo de inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina- Dissertação de Mestrado-Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato-CE, 2017.

JANA, S.; DEB, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 70, n. 2, p. 140-150, 2006.

JAVADPOUR, M. M., et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 3107-3113, 1996.

JUNIOR, José Adão Carvalho Nascimento et al. Análise dos pedidos de patentes recentes envolvendo ciclodextrinas no setor farmacêutico. **Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação**, v. 1, n. 1, 2015.

MAIA, Aline José et al. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 330-339, 2014.

MATIAS, E. F. F., et al. Screening the *in vitro* modulation of antibiotic activity of the extracts and fractions of *Ocimum gratissimum* L. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 9, p. 1902-1907, 2012.

OBIDI, O. F. et al. Antimicrobial activity of orange oil on selected pathogens. 2013. **The International Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 113-122, 2013.

OLUWATUYI, M., et al. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry Reviews**, v. 65, n. 1, p. 3249-3254, 2004.

PASSOS, C. S., et al. Terpenoides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 140-149, 2009.

RIBEIRO, S. D et al. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, 2012.

SALES, G.W.P.; BATISTA, A.H.M.; ROCHA, L.Q.; et al. Efeito antimicrobiano e modulador do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbaril* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 709-715, 2014.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from North Argentin for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 32: 293-297, 2001.

SCHUCK, V. J. A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, n.37, v. 1, p. 45-49, 2001.

SILVA, Priscila Veloso da. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Compostos de Inclusão Formados Entre Sulfadiazina de Sódio e Ciclodextrinas- **Dissertação de Mestrado**- Universidade Federal de Itajubá- UNIFEI, ITAJUBÁ-MG, 2015.

SOUSA, O. F et al. Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of  $\alpha$ -bisabolol,  $\beta$ -cyclodextrin and  $\alpha$ -bisabolol/ $\beta$ -cyclodextrin complex. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 1111-1118, 2017.

TEIXEIRA, Andréa Bessa. Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I, II e III de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown-**Tese de Doutorado**- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2009

TEIXEIRA, K.I.R. Estudo das alterações da membrana celular de microorganismos por compostos de inclusão de clorexidrina:Beta-ciclodextrina em diferentes proporções molares usando microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L.; **Microbiologia-10ª Edição**. Artmed Editora, 2012.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, M.G.; et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

VIEGAS, J. C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, n. 26, v. 3, p. 390-400, 2003.

VUUREN, V. S. F.; VILJOEN, A. M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8-cineole alone and in combination. **Flavour and fragrance journal**, v. 22, n. 6, p. 540-544, 2007.

WANG, Yong-Wei et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) Peel. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 3, p. 3382-3393, 2012.

XIE, Hudie et al. Host-guest inclusion system of artesunate with  $\beta$ -cyclodextrin and its derivatives: Characterization and antitumor activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1085, p. 90-96, 2015.

ZAHI, M. R. et al. Enhancing the antimicrobial activity of d-limonene nanoemulsion with the inclusion of  $\epsilon$ -polylysine. **Food chemistry**, v. 221, n.1, p. 18-23, 2017.

ZHANG, Z. et al. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. **Food chemistry**, v. 150, n.1, p. 307-312, 2014.