

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS MONOTERPENOS (R)-(+)-
CITRONELAL, (S)-(-)-CITRONELAL E 7-HIDROXICITRONELAL CONTRA
CEPA DE *BACILLUS SUBTILIS***

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF (R)-(+)-CITRONELLAL, (S)-(-)-CITRONELLAL
AND 7-HYDROXYCITRONELLAL MONOTERPENES AGAINST *BACILLUS
SUBTILIS* STRAIN

RAQUEL VIEIRA **BEZERRA**. Graduanda de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

HELOÍSA MARA BATISTA FERNANDES DE **OLIVEIRA**. Farmacêutica-Bioquímica do Hospital Universitário Ana Bezerra-UFRN.

CALIANDRA MARIA BEZERRA LUNA **LIMA**. Professora Doutora da Universidade Federal da Paraíba.

MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO **DINIZ**. Professora Doutora da Universidade Federal da Paraíba.

HILZETH DE LUNA FREIRE **PÊSSOA**. Professora Doutora da Universidade Federal da Paraíba.

ABRAHÃO ALVES DE **OLIVEIRA FILHO**. Professor Doutor da Universidade Federal de Campina Grande

Estrada Patos – Teixeira, Jatobá, Patos-PA, CEP 58700-970. E-mail: abrahamo.farm@gmail.com

RESUMO

O citronelal, pertencente ao grupo dos monoterpenos é uma das substâncias majoritárias de óleos essenciais de plantas aromáticas como as do gênero *Cymbopogon* e *Eucalyptus*, revelando ter inúmeras atividades biológicas, dentre elas ação antimicrobiana. Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico dos monoterpenos e a importância do combate às infecções causadas pelas bactérias multirresistentes, o presente estudo objetiva avaliar a atividade antibacteriana dos monoterpenos (R)-(+)-Citronelal, (S)-(-)-Citronelal e 7-Hidroxicitronelal contra a cepa de *Bacillus subtilis*. Para a realização da atividade foi analisada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos contra a cepa de bactéria escolhida, além disso, utilizou-se o antibacteriano cloranfenicol como controle positivo. Os monoterpenos (R)-(+)-Citronelal e (S)-(-)-Citronelal apresentaram CIM igual a 256 µg/mL e o 7-hidroxicitronelal apresentou CIM de 512 µg/mL. Com os resultados analisados conclui-se que os monoterpenos em estudo podem ser utilizados como uma alternativa terapêutica para o combate de infecções causadas por bactérias do gênero *Bacillus*.

PALAVRAS-CHAVE: Terpenos. Microbiologia. Fitoterapia.

ABSTRACT

Citronellal, belonging to the group of monoterpenes and is one of the major substances of essential oils of aromatic plants as well as of the genus *Cymbopogone Eucalyptus*, revealing to have numerous biological activities, among them antimicrobial action. Thus, based on the information about the therapeutic potential of monoterpenes and the importance of combating infections caused by multiresistant bacteria, this study aims to evaluate the antibacterial activity of the monoterpenes (R)-(+)-Citronellal, (S)-(-)-Citronellal and 7-Hydroxycitronellal against the *Bacillus subtilis* strain. For the accomplishment of the study the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the compounds against the bacterial strain chosen was analyzed, in addition, the antibacterial chloramphenicol was used as positive control. The (R)-(+)-citronellal and (S)-(-)-citronellal monoterpenes presented MIC equal to 256 µg / mL and 7-hydroxycitronellal presented MIC of 512 µg / mL. Analyzing the results, it was concluded that the monoterpenes under study can be used as a therapeutic alternative to combat infections caused by bacteria of the genus *Bacillus*.

KEYWORDS: Terpenes. Microbiology. Phytotherapy.

INTRODUÇÃO

O uso de espécies vegetais para a cura de doenças e sintomas remonta ao começo da civilização, desde que o homem começou a usar e a modificar os recursos naturais para seu próprio benefício. Esta prática ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o processo evolutivo e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recurso terapêutico eficaz (ROSSATO, 2013).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários extraídos de diversas partes de plantas, possuem composição química complexa e garantem aos vegetais vantagens adaptativas no meio em que estão inseridos. O uso de óleos essenciais para o controle de microrganismos vem sendo ampliado devido principalmente à busca por substâncias alternativas para o controle de microrganismos resistentes a antibióticos (ALVARENGA, 2016; GEROMINI, 2013).

Segundo Monteiro (2015) o aparecimento de estirpes de organismos patogênicos resistentes à terapêutica, o aumento da população de imunocomprometidos e a crescente falta de antimicrobianos eficazes são alguns dos fatores que estimulou o estudo das propriedades dos óleos essenciais e os seus fitoconstituintes. A eficácia na inibição do desenvolvimento bacteriano, incluindo estirpes resistentes a antibióticos, leveduras e fungos filamentosos impulsionou o estudo da sua atividade antimicrobiana.

Dentre os vários produtos naturais e/ou sintéticos bastante pesquisados na farmacologia pode-se citar os composto terpênicos, que são divididos de acordo com o número de carbono (C) em suas moléculas, em isoprenos ou hemiterpenos (5 C), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C); diterpenos (20 C); sesterpenos (25 C); triterpenos (30 C); tetraterpenos (40 C) e polisoprenóides (n C) (BAKKALI et al., 2008; SPITZER, 2004).

O fitoconstituente citronelal pertence ao grupo dos monoterpenos, é uma das substâncias majoritárias de óleos essenciais de plantas aromáticas como as do gênero *Cymbopogon* e *Eucalyptus* e pode ser isolado como uma mistura não-

racêmica dos enantiômeros R e S, revelando ter inúmeras atividades biológicas, dentre elas ação antimicrobiana, antioxidante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011; ZORE et al., 2011).

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico dos monoterpenos e a importância do combate às infecções causadas pelas bactérias multirresistentes, esse trabalho inovador procura avaliar a atividade antibacteriana dos monoterpenos (R)-(+)-Citronelal, (S)-(-)-Citronelal e 7-hidroxicitronelal contra a bactéria *Bacillus subtilis*.

METODOLOGIA E VIABILIDADE

Ensaio *in vitro*

Substâncias-teste

Os monoterpenos (R)-(+)-Citronelal, (S)-(-)-Citronelal e 7-hidroxicitronelal foram adquiridos da Indústria Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP). Para a realização dos ensaios farmacológicos, as substâncias foram solubilizadas em DMSO e diluídas em água destilada. A concentração de DMSO (dimetilsulfóxido) utilizada será 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).

Espécie Bacteriana e Meio de cultura

Foi utilizada a bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* adquirida do Laboratório BioGer da Universidade Federal da Paraíba. A cepa foi mantida em meio Luria Bertani (LB) (constituído por: extrato de levedura (DIFCO) 10 g, triptona (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 foi 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).

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 de cada monoterpeno na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado). 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.

Paralelamente, foi realizado o controle positivo com o antibacteriano cloranfenicol. 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 foram 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 - 48 horas para ser realizada a leitura. A CIM para os monoterpenos e o antibacteriano foi 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme Toscan (2014) a utilização de produtos naturais ou seus derivados como agentes de controle de populações microbianas atrai também a indústria farmacêutica, já que os patógenos associados a doenças infecciosas estão cada dia mais resistentes às drogas tradicionalmente utilizadas em práticas clínicas. Este problema vem alcançando proporções preocupantes e diante desta realidade a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida. Devido à sua atuação em células bacterianas, os produtos vegetais podem influenciar fatores de virulência e alterar a capacidade de infecção. Dessa forma, os terpenos poderão ser importantes alternativas para o controle de patógenos multirresistentes aos antimicrobianos convencionais.

Nesta perspectiva inserem-se as plantas medicinais, cuja utilização no tratamento de processos patológicos tem sido descrito ao longo da evolução humana e aprimorado com o avanço da ciência, através do estudo fitoquímico, da comprovação das propriedades terapêuticas e validação do uso (QUINTANS-JÚNIOR, 2014).

A rizobactéria *Bacillus subtilis* tem sido utilizada para estudos genéticos e bioquímicos há várias décadas e é considerada como paradigma de bactérias Gram-positivas formadoras de endósporos, é capaz de produzir mais de duas dúzias de antibióticos com uma incrível variedade de estruturas. Ela cresce rapidamente em ágar em qualquer condição, e as colônias têm características distintas. Uma das muitas bactérias encontradas naturalmente no interior do corpo humano, é também comum em legumes e outras plantas e no solo. Em geral, *B. subtilis* é considerado um microrganismo oportunista sem potencial patogênico para humanos, as bactérias só são prejudiciais quando as colônias crescem muito e começam a infectar o organismo (DE BOER SIETSKE, DIDERICHSEN, 1991; STEIN, 2005; 365saúde, 2017).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido foi testada para os monoterpenos (R)-(+)-Citronelal, (S)-(-)-Citronelal e 7-hidroxicitronelal nas diferentes concentrações contra a cepa de *Bacillus subtilis* e determinada pela menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano, conforme apresentado nas tabelas.

Tabela 1. Concentração mínima inibitória (CIM) em µg/mL do monoterpeneo (R)-(+)-citronelal contra a bactéria *Bacillus subtilis*.

Substância	<i>Bacillus subtilis</i> CCT 0516
(R)-(+)-citronelal (1024 µg/mL)	+
(R)-(+)-citronelal (512 µg/mL)	+
(R)-(+)-citronelal (256 µg/mL)	+
(R)-(+)-citronelal (128 µg/mL)	-
(R)-(+)-citronelal (64 µg/mL)	-
(R)-(+)-citronelal (32 µg/mL)	-
(R)-(+)-citronelal (16 µg/mL)	-
(R)-(+)-citronelal (8 µg/mL)	-
(R)-(+)-citronelal (4 µg/mL)	-
Controle negativo	-
Controle positivo	+

(-) Sem inibição (+) Inibição

Tabela 2. Concentração mínima inibitória (CIM) em µg/mL do monoterpeneo (S)-(-)-citronelal contra a bactéria *Bacillus subtilis*.

Substância	<i>Bacillus subtilis</i> CCT 0516
(S)-(-)-citronelal (1024 µg/ml)	+
(S)-(-)-citronelal (512 µg/ml)	+
(S)-(-)-citronelal (256 µg/ml)	+
(S)-(-)-citronelal (128 µg/ml)	-
(S)-(-)-citronelal (64 µg/ml)	-
(S)-(-)-citronelal (32 µg/ml)	-
(S)-(-)-citronelal (16 µg/ml)	-
(S)-(-)-citronelal (8 µg/ml)	-
(S)-(-)-citronelal (4 µg/ml)	-
Controle negativo	-
Controle positivo	+

(-) Sem inibição (+) Inibição

Tabela 3. Concentração mínima inibitória (CIM) em µg/mL do monoterpeneo 7-hidroxicitronelal contra a bactéria *Bacillus subtilis*.

Substância	<i>Bacillus subtilis</i> CCT 0516
7-hidroxicitronelal (1024 µg/ml)	+
7-hidroxicitronelal (512 µg/ml)	+
7-hidroxicitronelal (256 µg/ml)	-
7-hidroxicitronelal (128 µg/ml)	-
7-hidroxicitronelal (64 µg/ml)	-
7-hidroxicitronelal (32 µg/ml)	-
7-hidroxicitronelal (16 µg/ml)	-
7-hidroxicitronelal (8 µg/ml)	-
7-hidroxicitronelal (4 µg/ml)	-
Controle negativo	-
Controle positivo	+

(-) Sem inibição (+) Inibição

Os monoterpeneos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal apresentaram CIM (Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento das cepas) igual a 256 µg/mL e 7-hidroxicitronelal apresentou CIM de 512 µg/mL.

Sartorato et al. (2004) 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 os monoterpeneos podem ser considerados fortes inibidores frente as bactérias *Bacillus subtilis*.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pôde-se observar que os monoterpeneos testados apresentaram resultados relevantes. Diante disso, os monoterpeneos (R)-(+)-citronelal, (S)-(-)-citronelal e 7-hidroxicitronelal podem ser utilizados como uma alternativa terapêutica para o combate de infecções causadas por algumas bactérias do gênero *Bacillus*.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica do CSTR/UFCG e a UFCG, onde este trabalho foi desenvolvido com todo apoio.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA SANTOS FRAGA MIRANDA, C. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, 2016.

Bacillus subtilis Colônia Características. 365 Saúde. 2017. Disponível em: <http://www.365saude.com.br/pt-public-health-safety/pt-medical-research/1009011313.html>. Acesso em: 10 nov. 2017.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.446-475, 2008.

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.

DE BOER SIETSKE, A.; DIDERICHSEN, B. On the safety of Bacillus subtilis and B. amyloliquefaciens: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 1-4, 1991.

GEROMINI, K.V.N. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, 2013.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v.11, p. 137-147, 2000.

MONTEIRO, A.R.P. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

QUINTANS-JÚNIOR, L. et al. Antinociceptive Action and Redox Properties of Citronellal, an Essential Oil Present in Lemongrass. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 6, p. 630–639, 2011.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J. et al. Monoterpenos com atividade anti-inflamatória: uma prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 2, p. 867-875, 2014.

ROSSATO, A.E. et al. **Fitoterapia racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos**. 1ª ed. Florianópolis: Diretoria da Imprensa Oficial e Editora de Santa Catarina, 2013, p. 15-39.

SPITZER, C. M. O. S. V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p. 467-495.

STEIN, T. Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845-857, 2005.

TOSCAN, C.M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.

ZORE, G. B. et al. Phytomedicine Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 18, n. 13, p. 1181–1190, 2011.