

# COMPARAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DE (R)-(+)-CITRONELAL E (S)-(-)-CITRONELAL CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

COMPARATION OF ANTIBACTERIAL EFFECT OF MONOTERPENES (R) - (+) - CITRONELAL E (S) - (-) - CITRONALAL AGAINST *Staphylococcus aureus*

DANIELE DE SOUZA SIQUEIRA<sup>1</sup>, JOSÉ LUCAS SOARES FERREIRA<sup>1</sup>, JOYCE NATIELLE MIRANDA CAVALCANTE<sup>1</sup>, REBECA CÍCERA MENDES DE OLIVEIRA SILVA<sup>1</sup>, RAFAEL CARTAXO FILGUEIRA<sup>1</sup>, RAQUEL VIEIRA BEZERRA<sup>1</sup>, HELOÍSA MARA BATISTA FERNANDES DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO DINIZ<sup>3</sup>, HILZETH DE LUNA FREIRE PESSOA<sup>4</sup>, ABRAHÃO ALVES DE OLIVEIRA FILHO<sup>5</sup>\*

1. Acadêmicos do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande; 2. Farmacêutica-Bioquímica do Hospital Universitário Ana Bezerra – UFRN; 3. Professora Titular da Universidade Federal da Paraíba; 4. Professora Associada da Universidade Federal da Paraíba; 5. Professor Doutor, do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

\* Estrada Patos-Teixeira, Jatobá, Patos, Paraíba, Brasil. CEP: 58700-970. [abraham.farm@gmail.com.br](mailto:abraham.farm@gmail.com.br)

Recebido em 08/04/2019. Aceito para publicação em 13/05/2019

## RESUMO

As doenças infecciosas, segundo a OMS são responsáveis por cerca de 33% das causas de mortalidade no mundo. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria presente em doenças infecciosas orais, sendo mais comumente encontrada em casos de falha no tratamento endodôntico, contribuindo para o aumento da resistência bacteriana. O presente trabalho objetiva avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal contra as cepas de *S.aureus*. Para a determinação da CIM dos fitoconstituintes selecionados, foram utilizadas cepas bacterianas de *S. aureus* e foi realizada a técnica de microdiluição em placa de 96 orifícios por meio da diluição seriada a uma razão de dois, utilizando como controle positivo o cloranfenicol. Após a leitura da CIM em 48 horas, alíquotas foram retiradas de cada poço da placa de microdiluição que não apresentaram crescimento bacteriano, e transferidas para poços de uma nova placa de microdiluição desprovidas de qualquer antimicrobiano. As placas inoculadas foram assepticamente fechadas e incubadas e as CBMs foram registradas após 48 horas. Com base nos dados obtidos foi possível concluir que os monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal possuem efeito bacteriostático sobre as cepas de *S. aureus*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Saúde pública, microbiologia, monoterpeno.

## ABSTRACT

Infectious diseases, according to one WHO account for about 33% of the world's leading causes of death. *Staphylococcus aureus* is a bacterium present in infectious diseases, being more common in cases of failure in endodontic treatment, contributing to the increase of bacterial resistance. The present work aims (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (CBM) of the monoterpenes (R) - (+) - citronellal and (S) - (-) - citronellal against strains of *S. aureus*. To the determination of the CIM of the phytochemicals checked, were used bacterial strains of *S. aureus* and the industrial was a microdilution in the plate of non- the-per-sequential hardening of mi-

crogenilution in the chipset of microgenilution, using a control positive or cloranfenicol. After reading the MIC in 48 hours, the particles were removed from each microtiter plate well which are not bacterial growth, and those transferred to wells of a new microtiter plate were devoid of any antimicrobial. The inoculated plates were aseptically closed and incubated and the CBMs were after 48 hours. Based on the data obtained it was possible to conclude that the (R) - (+) - citronellal and (S) - (-) - citronellal monoterpenes have a bacteriostatic effect on aureus strains.

**KEYWORDS:** Public health, microbiology, monoterpeno.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas, segundo a OMS são responsáveis por cerca de 33% das causas de mortalidade no mundo, ocupando a primeira posição entre as principais causas de morte em países subdesenvolvidos<sup>1</sup>. A grande disseminação de doenças infecciosas bacterianas deve-se ao fato de cepas resistentes a antibióticos<sup>2</sup>.

A literatura relata um crescimento do número de infecções hospitalares associadas à *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina<sup>3</sup>. O *S. aureus* é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos gram-positivos, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espíngulas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras)<sup>4</sup>.

*S. aureus* é um patógeno comum em doenças infecciosas orais como a cárie e infecções endodônticas, sendo mais comumente encontrada em casos de falha no tratamento endodôntico, o que contribui para o aumento da resistência bacteriana<sup>5,6</sup>.

Diante disso, o estudo farmacológico das drogas vegetais – planta inteira ou partes -, evidencia um campo inesgotável de novos conhecimentos científicos e geradores de riquezas, que colabora notavelmente para o aprimoramento da medicina tradicional<sup>7</sup>.

Com o crescente aumento da resistência aos antibióticos torna-se mais viável e necessária a utilização dos óleos essenciais e seus constituintes, como alternativas terapêuticas<sup>8</sup>. Os óleos essenciais são derivados do metabolismo secundário das plantas, e na literatura são muito estudados para o tratamento de diferentes doenças infecciosas<sup>5,9</sup>.

Dentre os vários componentes dos óleos essenciais estão os terpenos que possuem ação antimicrobiana, antiviral e antineoplásica<sup>8</sup>. O citronelal (3,7-dimetil-oct-6-enal) é um monoterpeno que pode ser isolado como uma mistura não racêmica dos enantiômeros R e S por destilação com arraste de vapor ou extração por solventes. Ele está presente em plantas do gênero *Cymbopogon*, dentre elas o *C. citratus*, o capim-santo, muito usado na medicina popular como ansiolítico, antialérgico e analgésico<sup>10</sup>.

Nesse contexto, os terpenoides são reconhecidos, por apresentar um enorme potencial biológico, uma vez que vários de seus compostos monoterpênicos, já revelou diversos resultados positivos, o que inclui ação antimicrobiana<sup>11</sup>.

Com base nas informações sobre o potencial terapêutico dos monoterpenos e a importância em buscar novas alternativas terapêuticas frente a crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos atualmente utilizados, este trabalho objetiva avaliar a possível atividade antibacteriana dos monoterpenos (R)-(+)- citronelal e (S)-(-)-citronelal contra cepas de *S. aureus*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Local de trabalho

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, estado da Paraíba, Brasil.

### Cepas bacterianas

Foram utilizadas cepas bacterianas de *S. aureus* ATCC 25925 e clínicas (101, 102, 103 e 104), 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hilzeth de Luna Freire Pessôa.

### Fitoconstituintes

Os monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)- citronelal foram adquiridos da Indústria Sigma- Aldrich<sup>R</sup> (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 será inferior a 0,1% v/v.

### Controle positivo

Foi usado como controle positivo o antimicrobiano Cloranfenicol, adquirido da Sigma- Aldrich<sup>R</sup> (São Paulo - SP).

### Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima dos monoterpenos foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo<sup>12</sup>. Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido Muller-Hinton duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão de cada 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 x 10<sup>8</sup> UFC/mL das espécies bacterianas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa de bactéria, especificamente.

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 Muller-Hinton 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 Muller-Hinton 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.

### Determinação da concentração bactericida mínima

Depois de ler os resultados da CIM, a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada; três diluições de 10 µL da CIM, foram inoculadas em caldo Muller-Hinton (100µL/poço) em placas de microdiluição estéreis e, em seguida, foram incubadas 35-

37°C durante 24-48 horas. Então, 20 µL de resazurina foram adicionadas. As placas foram incubadas por 24 horas a 35-37°C e depois se confirmou a concentração capaz de inibir o crescimento global de espécies bacterianas, verificado onde não houve coloração do indicador<sup>13,14</sup>.

### 3. RESULTADOS

#### Concentração inibitória mínima (CIM) em meio líquido

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido foi determinada para o (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal nas diferentes concentrações sugeridas na metodologia e determinada pela menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano, conforme apresentado nas tabelas. Observou-se que os resultados testados variaram entre 128 e 1024µg/mL.

**Tabela 1.** Concentração mínima inibitória (CIM) do monoterpeno (R)-(+)-citronelal contra diferentes cepas de *S. aureus*

Cepa bacteriana/ Substância	S. <i>aureus</i> ATCC 25925	S. <i>aureus</i> 101	S. <i>aureus</i> 102	S. <i>aureus</i> 103	S. <i>aureus</i> 104
1024 µg/mL	+	+	+	+	+
512 µg/mL	+	-	-	-	+
256 µg/mL	+	-	-	-	+
128 µg/mL	-	-	-	-	+
64 µg/mL	-	-	-	-	-
32 µg/mL	-	-	-	-	-
16 µg/mL	-	-	-	-	-
8 µg/mL	-	-	-	-	-
4 µg/mL	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-	-

(-) sem inibição (+) inibição

**Tabela 2.** Concentração mínima inibitória (CIM) do monoterpeno (S)-(-)-citronelal contra diferentes cepas de *S. aureus*.

Cepa bacteriana/ Substância	S. <i>aureus</i> ATCC 25925	S. <i>aureus</i> 101	S. <i>aureus</i> 102	S. <i>aureus</i> 103	S. <i>aureus</i> 104
1024 µg/mL	+	+	+	+	+
512 µg/mL	+	-	-	-	+
256 µg/mL	+	-	-	-	+
128 µg/mL	-	-	-	-	-
64 µg/mL	-	-	-	-	-
32 µg/mL	-	-	-	-	-
16 µg/mL	-	-	-	-	-
8 µg/mL	-	-	-	-	-

4 µg/mL	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-	-

(-) sem inibição (+) inibição

As plantas apresentam uma enorme diversidade estrutural e diversas propriedades físico-químicas e biológicas, justificando o crescente interesse de indústrias farmacêuticas na síntese de fármacos a partir destas fontes naturais<sup>15,16</sup>. Além disso, o aumento da resistência dos microrganismos às drogas disponíveis induz os pesquisadores à procura de novas alternativas terapêuticas, sendo os óleos essenciais e seus constituintes um alvo promissor para o encontro de novos fármacos com atividade antimicrobiana<sup>17</sup>.

Na literatura científica, 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. De acordo com os resultados os monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal demonstraram moderada atividade antibacteriana sobre as cepas de *S. aureus*, visto que obteve CIM50(Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das cepas) de 1024 µg/mL<sup>18</sup>.

#### Concentração Bactericida (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada a partir da menor concentração do monoterpeno que resultou em inibição visível do crescimento do microorganismo. De acordo com a tabela, não foi possível identificar a CBM para o (R)- (+) - citronelal e (S)-(-)-citronelal, pois todas as cepas cresceram na presença da concentração de 1024 µg/mL, maior concentração testada.

**Tabela 3.** Concentração bactericida mínima (CBM) do monoterpeno (R)-(+)-citronelal contra diferentes cepas de *S. aureus*.

Cepa bacteriana/ Substância	S. <i>aureus</i> ATCC 25925	S. <i>aureus</i> 101	S. <i>aureus</i> 102	S. <i>aureus</i> 103	S. <i>aureus</i> 104
1024 µg/mL	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-	-
256 µg/mL	-	-	-	-	-
128 µg/mL	-	-	-	-	-
64 µg/mL	-	-	-	-	-
32 µg/mL	-	-	-	-	-
16 µg/mL	-	-	-	-	-
8 µg/mL	-	-	-	-	-
4 µg/mL	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-	-

**Tabela 4.** Concentração bactericida mínima (CBM) do monoterpeno (S)-(-)-citronelal contra diferentes cepas de *S. aureus*

Cepa bacteriana/ Substância	<i>S. aureus</i> ATCC 25925	<i>S. aureus</i> 101	<i>S. aureus</i> 102	<i>S. aureus</i> 103	<i>S. aureus</i> 104
1024 µg/mL	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-	-
256 µg/mL	-	-	-	-	-
128 µg/mL	-	-	-	-	-
64 µg/mL	-	-	-	-	-
32 µg/mL	-	-	-	-	-
16 µg/mL	-	-	-	-	-
8 µg/mL	-	-	-	-	-
4 µg/mL	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-	-

(-) sem inibição (+) inibição

Para um composto ser considerado bactericida ou bacteriostático de acordo com 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<sup>19</sup>. Diante dos dados da literatura os monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal possui efeito bacteriostático sobre as cepas de *S. aureus*.

#### 4. DISCUSSÃO

As práticas médicas populares utilizam elementos naturais que, na maioria das vezes, são os únicos recursos disponíveis nos ambientes onde estão instaladas as comunidades e, a constante busca por novos medicamentos com base nestas práticas tradicionais, tem-se mostrado eficaz<sup>20</sup>. A acentuada resistência bacteriana gera uma necessidade de desenvolver novos fármacos e a pesquisa com plantas medicinais, como fontes de substâncias bioativas vêm sendo um indicativo para descoberta de eficientes agentes terapêuticos<sup>21</sup>.

Através de revisão sistemática da literatura, foi possível identificar o citronelal como componente majoritário do óleo essencial de *Cymbopogon nardus*.

Na mesma pesquisa, observou-se também atividade bacteriana do óleo de *C. nardus* para cepas de *S. aureus*<sup>22</sup>.

#### 5. CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos foi possível concluir que os monoterpenos (R)-(+)-Citronelal e (S)-(-)-citronelal

possuem atividade antimicrobiana sobre as cepas de modo que o monoterpeno em estudo pode ser considerado como potencial antibacteriano para futuros estudos de desenvolvimento de novos antimicrobianos e ou fitoterápicos para o combate de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, em casos de reinfecções endodônticas por exemplo.

#### REFERÊNCIAS

- [1] WHO. The Global Burden of Disease 2004. Geneva: World Health Organization; 2008.
- [2] Vuong C, Yeh A, Cheung G, Otto M. Investigational drugs to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Expert Opinion on Investigational Drugs. 2015;25(1):73-93.
- [3] Otto M. MRSA virulence and spread. Cellular Microbiology [Internet]. 2012 [cited 5 October 2017];14(10):1513-1521. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747834>.
- [4] Rodrigues FJB, Barroso APD. Etiologia e sensibilidade bacteriana em infecções do tracto urinário. Revista Portuguesa de Saúde Pública. 2011;29(2):123-131.
- [5] Botelho M, Nogueira N, Bastos G, Fonseca S, Lemos T, Matos F et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2007;40(3):349-356.
- [6] Tiralí R, Turan Y, Akal N, Karahan Z. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. 2009;108(5):e117-e120.
- [7] Sixel P, Pecinalli N. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. Infarma-Ciências Farmacêuticas. 2013;16(13):74-77.
- [8] Amaral J, Santos F, Sousa F, Almeida F. Atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell [mestre]. Arg. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza; 2004.
- [9] Saad A, Fadli M, Bouaziz M, Benharref A, Mezrioui N, Hassani L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. Phytomedicine. 2010;17(13):1057-1060.
- [10] Santos A, Paduan R, Gazin Z, Jacomassi E, D' Oliveira P, Cortez D et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2009;19(2a):436-441.
- [11] Costa A. Estudo in vitro e in silico da atividade antifúngica dos isômeros R-(+) e S-(-) citronelal sobre fungos do gênero *Cryptococcus* [Mestre]. Universidade Federal da Paraíba; 2017.
- [12] Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. 1st ed. Antibiotics in Laboratory Medicine. New York: Williams & Wilkins. 1991;739-788.
- [13] Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds

- of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*.2008;7(12):1797-1806.
- [14] Guerra FQS, Mendes JM, Oliveira WA, Costa JGM; Coutinho HDM, Lima EO. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cinnamomum zeylanicum* blume essential oil on multi-drug resistant *Acinetobacter* spp. strains . *Revista de Biologia e Farmacia*. 2013;8 (1):62-70.
- [15] Bresolin T, Cechinel Filho V. Ciências farmacêuticas. Itajaí: Ed. da UNIVALI; 2008
- [16] Bresolin T, Cechinel Filho V. FÁRMACOS e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Santos; 2010.
- [17] Sarto M, Zanusso Junior G. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. *Revista uninga review*. 2018;20(1).
- [18] Sartoratto A, Machado A, Delarmelina C, Figueira G, Duarte M, Rehder V. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004;35(4):275-280.
- [19] Hafidh R, Abdulmir A, Vern L, Bakar F, Abas F, Jahanshiri F et al. Inhibition of Growth of Highly Resistant Bacterial and Fungal Pathogens by a Natural Product. *The Open Microbiology Journal*. 2011;5(1):96-106.
- [20] Ribeiro DA, Macêdo DG, Oliveira LGS., Saraiva ME, Oliveira SF, Souza MMA, *et al.* . Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Rev. bras. Plantas med* [Internet]. 2014 Dec [cited 2018 Mar 26] ; 16( 4 ): 912-930. Available from:[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722014000400018&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000400018&lng=en).  
[http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13\\_059](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/13_059).
- [21] Alencar L, Chaves T, Santos J, Nóbrega F, Araújo R, Santos V et al. Efeito modulador do extrato de plantas medicinais do gênero *Spondias* sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* à Eritromicina. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. 2015;36(1).
- [22] Andrade M, Cardoso M, Batista L, Mallet A, Machado S. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*. 2012;43(2):399-408.