



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO MONOTERPENO (R)- (+) – CITRONELAL CONTRA CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

¹Maria Alice Araújo de Medeiros, ¹Millena de Souza Alves, ¹Karla de Lima Alves Simão, ¹Camilla Torres Pereira, ¹Bruna de Lima Alves Simão, ¹Aline de Farias Diniz¹, ²Aleson Pereira de Sousa, ²Cássio Ilan Soares Medeiros, ¹Gymenna Maria Tenório Guênes, ¹Raline Mendonça dos Anjos, ¹Rosália Severo de Medeiros, ¹Maria Angélica Sátyro Gomes Alves, ¹Luciano de Brito Júnior, ¹Manuella Santos Carneiro Almeida and ^{*}Abrahão Alves de Oliveira Filho

¹Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB

²Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB

ARTICLE INFO

Article History:

Received 29th June, 2019

Received in revised form

22nd July, 2019

Accepted 09th August, 2019

Published online 28th September, 2019

Key Words:

Bactéria,
Fitoterapia,
Microbiologia.

ABSTRACT

Objetivo: O presente trabalho objetiva avaliar a atividade antibacteriana do monoterpene (R)-(+)-citronelal contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*. **Métodos:** Para realizar a atividade antibacteriana utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, obtendo-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). O ensaio foi realizado em duplicata, utilizando-se uma placa de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C durante 24-48 horas. A CIM foi determinada como a menor concentração da substância que inibir o crescimento visível do microrganismo. Após a leitura da CIM, alíquotas foram retiradas de cada poço da placa de que não apresentaram crescimento bacteriano, e transferido para poços de uma nova placa, desprovida de qualquer antimicrobiano. As placas inoculadas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C, e as Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) foram registradas após 48 horas. A CBM foi definida como a menor concentração da substância que resultar em inibição visível do crescimento do microrganismo. **Resultados:** Observou-se que o monoterpene (R)-(+)-citronelal apresentou uma CIM₅₀ igual a 1024 µg/mL e a CBM₅₀ maior que 1024 µg/mL para *Klebsiella Pneumoniae*. **Conclusão:** Diante dos resultados obtidos verifica-se que o (R)-(+)-citronelal possui um efeito moderado antibacteriano contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Copyright © 2019, Millena de Souza Alves et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Millena de Souza Alves, Maria Alice Araújo de Medeiros, Camilla Torres Pereira, Karla de Lima Alves Simão et al. 2019. "Avaliação da atividade antibacteriana do monoterpene (r)- (+) – citronelal contra cepas de klebsiella pneumoniae", *International Journal of Development Research*, 09, (09), 29589-29592.

INTRODUCTION

A *Klebsiellapneumoniae* é uma bactéria gram-negativa, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, encapsulada, aeróbia, com forma de bastão, não esporulado e não móvel, cujo tamanho pode variar de 0,3 a 1 µm de diâmetro e 0,6 a 6µm de comprimento e que está intimamente relacionada com a pneumonia nosocomial. Algumas espécies de *Klebsiellapneumoniae* têm a capacidade de produzir a enzima carbapenemase, dispondo assim a capacidade de inativar um amplo número de agentes antimicrobianos, sendo a principal causadora de certas infecções. (MARTÍNEZ et al., 2004; ANVISA, 2011). A *Klebsiellapneumoniae* faz parte da microbiota da orofaringe e do intestino, mas em indivíduos

com a imunidade comprometida e hospitalizados, essa bactéria encontra um habitat favorável para obter o seu desenvolvimento, podendo ocasionar infecções em qualquer sítio anatômico. O número de infecções hospitalares causadas por *K. pneumoniae* cada vez maior devido a sua elevada resistência aos antimicrobianos de amplo espectro, o que ressalta a importância de seu controle e monitoramento dentro do ambiente hospitalar (SCARPATE, 2009; FALAGAS et al., 2014). Nessa conjuntura, estudos relacionados à resistência apresentada por essa bactéria a antimicrobianos, apontam que nos últimos anos essa temática se tornou um obstáculo diante de todos os aspectos relacionados a saúde pública. Nesse âmbito, é comum se deparar com notícias sobre mortes provocadas pela bactéria *Klebsiellapneumoniae* carbapenemase (KPC), ocasionando alarme em diversas partes do Brasil. A prova disso é que, segundo dados do Ministério

***Corresponding author:** Abrahão Alves de Oliveira Filho,
Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB.

da Saúde, no Distrito Federal foram realizadas 187 notificações de infecção no ano de 2010, sendo registrados 18 óbitos. Em São Paulo, o Hospital das Clínicas registrou 70 casos desde 2008. (BRASIL, 2010). É preciso buscar novas alternativas que contribua para humanidade, suprindo as dificuldades quanto à resistência bacteriana. Nesse contexto, é viável salientar que os fitoterápicos e as plantas medicinais nos dias atuais vêm constituindo uma modalidade de terapia complementar ou alternativa quanto às necessidades encontradas relacionadas à saúde, além disso, seu uso tem sido crescente na população de diversos países (WANDERLEY *et al.*, 2015). Diante do exposto, uma das ações que tem se utilizado recentemente para resolver o empecilho atual são os óleos essenciais de plantas. Sob esse viés, é necessário evidenciar que os óleos essenciais são considerados metabólitos secundários advindos de diferentes partes de plantas. Dessa forma, é utilizado para diversos âmbitos, dentre eles temos o controle de microrganismos que vem sendo ampliado devido justamente a necessidade pela busca por substâncias alternativas para o controle de microrganismos resistentes a antibióticos (MIRANDA *et al.*, 2016; GEROMINI *et al.*, 2013). Dessa maneira, os óleos essenciais são constituídos de um conjunto de compostos químicos, dando ênfase principalmente aos terpenos, na qual são compostos que tem a capacidade de poder agir de forma individual, aditiva ou sinergicamente com o intuito de melhorar a eficácia terapêutica de outras drogas, servindo assim de moléculas protótipos para estudos farmacológicos (COUTINHO *et al.*, 2015).

Dentre dos principais constituintes da maioria dos óleos essenciais, temos em destaque os monoterpênicos, em que possuem uma aplicação abrangente, além da sua síntese relacionada a fragrâncias e flavorizantes, os mesmos são considerados relevantes quanto a produção de fármacos, defensivos agrícolas e compostos biologicamente ativos. Além disso, os monoterpênicos compreendem uma série vasta de substâncias naturais e/ou sintéticas exibindo inúmeras atividades biológicas testadas e confirmadas tais como: fungicida e bactericida (CÁRDENAS-ORTEGA *et al.*, 2005, CRISTANI *et al.*, 2007, MICHEL, 2011, LENARDAO *et al.*, 2007). Deve-se enfatizar ainda um dos monoterpênicos mais importantes, o citronelal, em que apresenta diversas atividades biológicas, com destaque temos o seu uso como repelente, além disso, de acordo com uma revisão literária feita por Maia e Moore (2011) o monoterpene pode ser aplicado de forma tópica sendo apto de repelir insetos durante 4 horas seguidas. De fato, este monoterpene já indicou 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) e herbicida (BRITO *et al.*, 2012). Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do monoterpene (R)-(+)- citronelal frente às cepas de *Klebsiellapneumoniae*, a fim de contribuir para o surgimento de novas alternativas terapêuticas que colaborarem minimizando o impacto que vem sendo causado devido o surgimento de cepas multirresistentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio *in vitro*

Local de trabalho: O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro de Educação e Saúde

da Universidade Federal de Campina Grande, estado da Paraíba, Brasil.

Substâncias-teste: O monoterpene (R)-(+)- citronelal foi adquirido da Indústria Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP). Para efetuação 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).

Espécie Bacteriana e Meio de cultura: Foram utilizadas cepas bacterianas de *Klebsiellapneumoniae* ATCC 13883 e clínicas (101, 102, 103, 104, 105). Estas bactérias foram adquiridas pelo laboratório de Microbiologia da UACB/CSTR/UFCG. Todas as cepas foram mantidas em meio Ágar Muller Hinton (AMH) a uma temperatura de 4 °C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em AMH 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 do monoterpene foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000). Foi utilizada uma placa de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 µL do meio líquido caldo Muller Hinton duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão do monoterpene 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 das espécies bacterianas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa de bactéria, especificamente.

Simultaneamente, realizou-se o controle positivo com o antibacteriano cloranfenicol, adquirido da Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP). Um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo caldo 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 10 µL da suspensão bacteriana. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do caldo Muller Hinton em um orifício sem a suspensão das bactérias. O antimicrobiano utilizado na execução dos testes como controle positivo foi o cloranfenicol, adquirido da Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP). A placa foi assepticamente fechada e incubada a 35°C por 24 horas para ser realizada a leitura. A CIM para o monoterpene foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano verificado nos orifícios quando comparado com o

crescimento controle. O experimento foi realizado em duplicata.

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 caldo Muller Hinton, desprovidas de qualquer antimicrobiano. A placa inoculada foi assepticamente fechada e incubada a 35 °C, e as CBMs foram registradas após 48 horas. A CBM foi definida como a menor concentração de monoterpeno que resultou em inibição visível do crescimento do microrganismo (NCUBE; AFOLAYANA; OKOH, 2008; GUERRA *et al.*, 2012).

RESULTADOS

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido foi determinada para a substância do (R)-(+)-citronelal nas diferentes concentrações explicitadas na metodologia e determinada pela menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano, conforme apresentado na Tabela 1. A partir dos resultados foi observado que a CIM₅₀ foi igual a 1024 µg/mL para as cepas analisadas. Ademais, a CBM₅₀ para *Klebsiella Pneumoniae* foi maior que 1024 µg/mL.

Tabela 1. Concentração mínima inibitória (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL do monoterpeno (R)-(+)-citronelal contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*

Cepas de <i>Klebsiella Pneumoniae</i>	CIM(µg/mL)	CBM(µg/mL)
ATCC 13883	32	-
Kp 101	1024	-
Kp 102	1024	-
Kp 103	1024	-
Kp 104	1024	-
Kp 105	-	-

(-) Concentrações maiores que 1024 µg/mL, não avaliadas neste estudo. **Fonte:** Autoria Própria.

Segundo Sartoratto *et al.* (2004), os valores entre 50-500 µg/ml tem uma forte atividade, 600-1500 µg/ml tem uma moderada atividade e os valores acima de 1500 µg/ml tem uma fraca atividade antibacteriana. Dessa forma, analisando o resultado da CIM₅₀ podemos afirmar que o (R)-(+)-citronelal possui efeito moderado frente às cepas de *Klebsiella Pneumoniae*. Conforme Hafidh *et al.* (2011), para que um composto seja considerado bactericida ou bacteriostático de acordo com a Concentração Bactericida Mínima (CBM), esta deve ser igual ou duas vezes mais que a CIM ou a CBM deve ser maior que duas vezes a CIM, respectivamente. Com isso, ao verificar a CBM₅₀ pode-se concluir que a substância do (R)-(+)-citronelal para as cepas de *Klebsiella Pneumoniae* não possui atividade bactericida, pois a Concentração Bactericida Mínima foi maior do que 1024 µg/mL frente às cepas.

DISCUSSÃO

É válido ressaltar que a fitoterapia é tida nos dias atuais como uma ferramenta terapêutica composta por produtos naturais considerados por dar origem a novos medicamentos com atividade antibacteriana (LIMA JUNIOR & DIMENSTEIN, 2006; DAVID *et al.*, 2015). Dentre os produtos naturais,

podemos destacar o citronelal visto que o mesmo já foi estudado e comprovado por apresentar ação antimicrobiana (SEIXAS *et al.*, 2011; CAVALCANTI *et al.*, 2011). De acordo com um estudo de Siqueira *et al.* (2019), o monoterpeno (R)-(+)-citronelal demonstrou atividade antimicrobiana frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, evidenciando concentrações variando entre 128 e 1024 µg/mL. Do mesmo modo, Bezerra *et al.* (2019) constatou efeitos satisfatórios do monoterpeno (R)-(+)-citronelal contra a cepa de *Bacillus Subtilis*, com uma CIM (Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento das cepas) igual a 256 µg/mL.

CONCLUSÃO

É imprescindível, portanto, analisar que os resultados indicam que o monoterpeno (R)-(+)-citronelal possui efeito antibacteriano significativo. Contudo, é necessário realizar mais estudos científicos que possam elucidar o mecanismo da ação da substância em estudo. Dessa maneira, o monoterpeno (R)-(+)-citronelal poderá futuramente ser considerado como uma alternativa terapêutica eficaz para minimizar os impactos que vem sendo causado por cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes.

REFERÊNCIAS

- Andrade, M.A. *et al.* 2012. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n.2, p. 399-408.
- Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. *Pediatria: Prevenção e controle de infecção hospitalar/ Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.* – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- Bezerra R. V. *et al.* 2019. Atividade antimicrobiana dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal, (S)-(-)-citronelal e 7-hidroxycitronelal contra cepa de *Bacillus Subtilis*. *Revista Uringá*, v. 56, n. 2, p. 62-69.
- Brasil. 2010. Ministério da Saúde. Portaria nº 930, de 27 de agosto de. Disponível em: Acesso: 10 set. 2019.
- Brito, D. R. *et al.* 2012. Effect of citronella oil, eucalyptus and citronellal compound of mycoflora and development of maize plants. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v.3, n. 4, p. 184-192.
- Cárdenas-Ortega, N. C. *et al.* 2005. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *I Mexicana Gray*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 53, p. 4347–4349.
- Cavalcanti, Y. M. *et al.* 2011. Screening of essential oils antifungal activity on *Candida* strains. *Odontologia Clínica-Científica, Recife*, p. 243-246.
- Cleeland R, Squires E. 1991. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: Williams & Wilkins, p. 739-788.
- Coutinho, H. D. *et al.* 2015. Avaliação comparativa da modulação de antibióticos, frente às cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. *Revista Ciências de la Salud*, v. 13, n. 3, p. 345-354.
- Cristani, 2007. Mariateresa *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, 6300-6308.
- David, B. *et al.* 2015. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem. Rev.*, v.14, p.299-315.
- Falagas, M. E. *et al.* 2014. Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infection. *Emerging Infectious Diseases*, v. 20, n. 7 1170- 1175.
- Geromini, K.V.N.*et al.* 2013. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, v. 15, n. 2.
- Guerra F. Q.S. *et al.* 2012. Chemical Composition And Antimicrobial Activity Of Cinnamomumzeylanicum Blume Essential Oil On Multi-Drug Resistant Acinetobacter spp. strains. *Revista de Biologia e Farmacia*, v. 8, n.1, 62-70.
- Hadacek F, Greger H. 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analyses*, v. 11, n. 3, p. 137-147.
- Hafidh, Rand R. *et al.* 2011. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J*, v. 5, p. 96–106.
- Lenardao, Eder J. *et al.* 2007. Citronellal as key compound in organic synthesis. *Tetrahedron*, v. 63, n. 29, p. 6671-6712.
- Lima Júnior, J.F.; Dimenstein, M.A. 2006. Fitoterapia na Saúde Pública em Natal/RN: visão do odontólogo. *Saúde Ver.*, v.8, p.37-44.
- Maia, M. F.; Moore, S. J. 2011. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, v.10, Suppl 1:S 11.
- Martinez, J. *et al.* 2004. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of Klebsiella. *Int Microbiol*, v. 7, n. 4, p. 261-8.
- Michel, 2011. Typhène *et al.* Epoxidation of α -pinene catalyzed by methyltrioxorhenium (VII): Influence of additives, oxidants and solvents. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 340, n. 1-2, p. 9-14.
- Miranda, C. A. S. F. *et al.*, 2016. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, n.1, p. 213-220.
- Ncube N. S.; Afolayan A. J.; Okoh A. I. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, v.7, n. 12, 1797-1806.
- Sartoratto A, Machado A, Delarmelina C *et al.* 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n. 4, p. 275-280.
- Scarpate, E. C. B.; Cossatis, J. J. 2009. A presença da Klebsiellapneumoniae produtora de β - lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. *Revista Saúde & Ambiente*, v. 4, n. 1, p. 1-11.
- Scherer, R. *et al.* 2009. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-india, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai, Botucatu*, v. 11, n. 4, p. 442-449.
- Seixas, T.L. *et al.* 2011. Controle fitopatológico do *Fusariumsubglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogonnardus*L.) e do composto citronelal. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*, v.13, p. 523-526.
- Siqueira, D. S. *et al.*, 2019. Comparação do efeito antibacteriano de (r)-(+)-citronelal e (s)-(-)-citronelal contra cepas de Staphylococcus aureus. *Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research – Bjsr*, v. 27, n.1, p. 28-32.
- Tomaz, M.A. *et al.* 2014. Chemical Composition and Allelopathic Activity of the *Eucalyptus* Essential Oil. *Bioscience Journal*, v. 30, p. 475-483.
- Wanderley, L. S. M. *et al.* 2015. Uso de Plantas Medicinai por Indivíduos da Comunidade do Valentina-PB. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde, Nova Esperança*, v. 13, n.2, p. 99-105.
