

*Avaliação da atividade antibacteriana do monoterpeno (S)-(-)- citronelal contra cepas de *Klebsiella pneumoniae**

*Evaluation of monoterpene (S)-(-)- citronellal antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae* strains*

Maria Alice Araújo de Medeiros

Universidade Federal de Campina Grande, E-mail: alicemedeiros123@hotmail.com

Millena de Souza Alves

Universidade Federal de Campina Grande, E-mail: millenaasouzaa@gmail.com

Karla de Lima Alves Simão

Universidade Federal de Campina Grande, E-mail: karlla_cb@hotmail.com

Camilla Torres Pereira

Universidade Federal de Campina Grande, E-mail: camilla.torres.cb@gmail.com

Bruna de Lima Alves Simão

Universidade Federal de Campina Grande, E-mail: brunna_2012pb@hotmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho

Universidade Federal de Campina Grande, E-mail: abrahao.farm@gmail.com

Resumo: utilização de produtos naturais tem impulsionado várias pesquisas, visto que a resistência bacteriana se tornou um empecilho na humanidade. Os monoterpenos são constituintes de óleos essenciais presentes em plantas, sendo os mesmos capazes de modificar a resistência microbiana. Dentre os monoterpenos, podemos exemplificar o citronelal, na qual apresenta atividade antimicrobiana. O presente estudo objetiva avaliar a atividade antibacteriana do monoterpeno (S)-(-)- citronelal contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Para a realização da 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. Observou-se que o monoterpeno (S)-(-)- citronelal apresentou uma CIM₅₀ igual a 1024 µg/mL para as cepas analisadas. Contudo, a CBM₅₀ para *Klebsiella Pneumoniae* foi maior que 1024 µg/mL. Diante dos resultados obtidos verifica-se que o (S)-(-)- citronelal possui um efeito moderado antibacteriano contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Palavras-chave: Bactéria; Fitoterapia; Microbiologia.

Abstract: A use of natural products spurred by several investigations, as bacterial resistance has become an important part of humanity. Monoterpenes are constituents of essential oils present in plants, being able to modify the microbial resistance. Among the monoterpenes, we can exemplify the citronellal, in which it has already presented antimicrobial activity. The present study aims to evaluate the antibacterial activity of monoterpene (S) - (-) - citronellal against *Klebsiella pneumoniae* strains. The antibacterial activity was performed using the broth microdilution technique, obtaining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (CBM). The assay was performed in duplicate using a 96-well plate. It was observed that the monoterpene (S) - (-) - citronellal presented a MIC₅₀ equal to 1024 µg / mL for the strains analyzed. However, the CBM₅₀ for *Klebsiella Pneumoniae* was greater than 1024 µg / mL. Conclusion: Based on the results obtained, it can be seen that (R) - (+) - citronellal has a moderate antibacterial effect against *Klebsiella pneumoniae* strains.

Key words: Bacterium; Phytotherapy; Microbiology.

Recebido em: 16/09/2019

Aprovado em: 23/10/2019



INTRODUÇÃO

A *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria apontada como um agente etiológico em diversas doenças como bacteremias, pneumonias, endocardite, meningite, entre outras. A respeito disso, é importante salientar que, essa bactéria é a causadora de patologias em indivíduos com baixa imunidade, como os recém-nascidos (NOGUEIRA et al., 2009).

Sob essa conjectura, a *Klebsiella pneumoniae* apresenta um perfil de sensibilidade cada vez mais restrito, sendo que não está relacionado somente à infecção, mas também a colonização (BORGES et al., 2015). Dessa maneira, existem inúmeros fatores que visam favorecer ao crescente número de infecções causadas por *K. pneumoniae*, em destaque temos a excessiva exposição aos antibióticos, uma vez em que os microrganismos vêm se tornando cada vez mais resistente aos medicamentos. (SELBACH et al., 2013; OKAMOTO et al., 2017).

Assim, uma das causas para que a *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) possa dispor a capacidade de inativar um amplo número de antimicrobianos é o fato de que, por ser uma bactéria KPC, possui um alto potencial de disseminação, com capacidade de acumular e transferir genes que favoreça a resistência bacteriana, dificultando o controle de epidemias proporcionando a elevação das taxas de mortalidade (ANVISA, 2011).

Nesse contexto, existem outras características que visam contribuir para a infecção por *K. pneumoniae* na UTI e aumentar a taxa de mortalidade. Segundo estudos realizados, a infecção por *K. pneumoniae* produtora da enzima carbapenemase associada ao transplante de órgãos, infecção de corrente sanguínea e admissão na UTI gera altas taxas de mortalidade (XU; SUN; MA, 2017).

Desse modo, é preciso realizar mais estudos enfatizando a produção de novos fármacos para combater as bactérias que vem desenvolvendo mecanismos de resistência. Essa temática desperta interesse em todos os âmbitos da saúde devido justamente à preocupação de que, em breve, será necessário desenvolver novas pesquisas já que não haverá mais antibióticos disponíveis para o tratamento de determinadas infecções ocasionadas por microrganismos. (FIGUEIRAL; FARIA, 2015). É inevitável, portanto, buscar por novas alternativas mais eficientes capazes de inibir o crescimento bacteriano, dentre elas temos em destaque as alternativas terapêuticas (TEXEIRA, 2009).

Partindo desse pressuposto, é compreensível que a resistência aos antimicrobianos é uma preocupação mundial podendo ser decorrente de uma consequência de seu uso clínico. Desse modo, torna-se uma questão essa ainda mais grave nos países em desenvolvimento devido ao frequente irracional uso dessas drogas (GOLD; MOELLERING, 1996; LUJÁN et al., 2015).

Ademais, é preciso destacar o citronelal, sendo uma das substâncias majoritárias de óleos essenciais de plantas aromáticas, como as do gênero *Cymbopogon* e *Eucalyptus*, em que exibem

propriedades antimicrobiana, inseticida e anticâncer (AVOSEH et al., 2015; BATUBARA et al., 2015).

Inúmeras plantas têm aptidão para produzirem o citronelal em mistura racêmica para serem empregadas em todo mundo, principalmente na América do Sul, no tratamento de diversas doenças, principalmente para o tratamento da dor (LU et al., 2006).

Contudo, apesar dos óleos essenciais contendo citronelal serem bastante utilizados para tratar diferentes condições patológicas de populações disseminadas em todo o mundo, como América do Sul e Ásia, as suas propriedades, em particularidade dos seus enantiômeros, ainda são pouco estudadas (NERIO et al., 2010).

Nesse sentido, torna-se evidente, portanto, ressaltar a importância de estudos relacionados a produtos naturais com intuito de reduzir doenças causadas por microrganismos patogênicos. Diante do exposto, este trabalho objetiva avaliar a atividade antibacteriana do monoterpene (S)-(-)- citronelal contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio *in vitro*

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).

Espécies Bacterianas e Meio de cultura

Foram utilizadas cepas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e clínicas (101, 102, 103, 104, 105). Estas bactérias foram adquiridas pelo laboratório de Microbiologia da UACB/CSTR/UFMG.

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 (S)-(-)- citronelal foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK, GREGER, 2000). Desse modo, utilizou-se uma placa de 96 orifícios

estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foi adicionado 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.

Paralelamente, 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 10µL 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.

A placa foi assepticamente fechada e incubada a 35°C por 24 - 48 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 monoterpene 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 do monoterpene que resultou em inibição visível do crescimento do microrganismo (NCUBE; AFOLAYANA; OKOH, 2008; GUERRA et al., 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa, observou-se que a CIM₅₀ (Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50% das cepas) do monoterpene (S)-(-)- citronelal foi igual a 1024 µg/mL, de acordo com a **Tabela 1**. Verificou-se ainda que a CBM₅₀ (Concentração Bactericida Mínima capaz de inibir 50% das cepas) para este composto foi maior que 1024 µg/mL.

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

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

(-) Concentrações encontradas maiores que 1024 µg/mL, não avaliadas neste estudo.

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 (S)-(-)- 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 (S)-(-)- 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.

É justo reconhecer que as substâncias isoladas advindos de produtos naturais tem a capacidade de apresentar atividade antibacteriana e, além disso, melhorar o efeito dos antibióticos aumentando o seu mecanismo de ação e impossibilitando a adaptação dos microrganismos (TEIXEIRA, 2009).

Diante disso, podemos destacar o citronelal, sendo visto como uma das substâncias predominantes de óleos essenciais presentes em plantas aromáticas (QUINTANSJUNIOR *et al.*, 2011), o mesmo já revelou ter diversas atividades, dentre elas, podemos especificar a 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).

Segundo um estudo de Siqueira et al. (2019), foi relatado que o monoterpene (S)-(-)- citronelal pode ser considerado como forte inibidor, em que o mesmo apresentou atividade antibacteriostática contra *Escherichia coli*, sendo viável para o tratamento de muitas doenças causadas pela bactéria em análise.

Ademais, no trabalho de Bezerra et al. (2019) demonstrou efeitos relevantes quanto o monoterpene (S)-(-)- citronelal, na qual foi visto como um forte inibidor frente as bactérias *Bacillus subtilis*, sendo o mesmo considerado como uma alternativa terapêutica eficaz para o minimizar infecções causadas por algumas bactérias do gênero *Bacillus*.

CONCLUSÃO

Em suma, percebe-se que os resultados obtidos foram satisfatórios, sendo assim, o monoterpene (S)-(-)- citronelal encontra-se com perspectiva para ser considerado como uma alternativa terapêutica. No entanto, torna-se viável o desenvolvimento de novos estudos para elucidar a ação do mesmo frente aos microrganismos patógenos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M.A. et al. 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, 2012.

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.

AVOSEH, O. et al. *Cymbopogon* Species; Ethnopharmacology, Phytochemistry and the Pharmacological Importance. **Molecules**. v.20, n.5, p.7438-7453, 2015.

BATUBARA, I. et al. Effects of Inhaled Citronella Oil and Related Compounds on Rat Body Weight and Brown Adipose Tissue Sympathetic Nerve. **Nutrients**. v.7, n.3, p.1859-1870, 2015.

BEZERRA R. V. et al. Atividade antimicrobiana dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal,(S)-(-)-citronelal e 7-hidroxicitronelal contra cepa de *Bacillus Subtilis*. **Revista Uringá**, v. 56, n. 2, p 262-69, 2019.

BORGES, F. K. et al. Perfil dos pacientes colonizados por enterobactérias produtoras de KPC em hospital terciário de Porto Alegre, Brasil. **Clinical & Biomedical Research**, v. 35, n. 1, 2015.

BRITO, D.V. et al. Effect of citronella oil, eucalipto and citronellal compound of mycoflora and development of maize plants. **Journal of Biotechnonology and Biodiversity**, v.3, p. 184-192, 2012.

CAVALCANTI, Y. M. et al. Screening of essential oils antifungal activity on *Candida* strains. **Odontologia Clínica-Científica**, Recife, p. 243-246, 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.

FIGUEIRAL, A. C. D.; FARIA, M. G. I. Klebsiella pneumoniae Carbapenemase: um problema sem solução? **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 9, n. 1, p. 45-48, 2015.

GOLD, H. S.; MOELLERING R.C. Antimicrobial-drug resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 19, p. 1445-1453, 1996.

GUERRA F. Q.S. et al. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Cinnamomum zeylanicum* Blume ESSENTIAL OIL ON MULTI-DRUG RESISTANT *Acinetobacter* spp. strains . **Revista de Biologia e Farmacia**, v. 8, n. 1, p. 62-70, 2012.

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

HAFIDH, Rand R. et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The open microbiology journal**, v. 5, p. 96, 2011.

LUJÁN, D. A. et al. Resistência a Antibióticos de Cepas *Escherichia coli* Isoladas de Infecções do Trato Urinário Adquiridas na Comunidade - Cidade de Lima, Peru. **Journal of Health** v. 14, n.1, p. 17-20, 2015.

LU, Y.H. et al. Citrus flavonoids in fruit and traditional Chinese medicinal food ingredients in China. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, p. 57–65, 2006.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African journal of biotechnology**, v. 7, n. 12, 2008.

NERIO, L.S. et al Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresour Technol**, v.101, p.372–378, 2010.

NOGUEIRA, P. S. F. et al. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Revista**

enfernagem UERJ, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 96-101, 2009.

OKAMOTO, Koh. et al. Modifiable Risk Factors for the Spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-Producing enterobacteriaceae among long-term acute-care hospital patients. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Cambridge, v.38, n. 6, p. 670-677, 2017.

QUINTANS-JÚNIOR, L. et al. Antinociceptive action and redox properties of citronelal, an essential oil present in lemongrass. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.6, p.630-639, 2011.

SARTORATTO A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.25, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-india, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SEIXAS, P. T. L. et al. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 523-526, 2011.

SELBACH, Luciano. **Influência da pressão de colonização sobre as taxas de bacteremias nosocomiais por staphylococcus aureus metilina-resistente (mrsa) no hospital de clínicas de porto alegre: análise da série histórica (2002 – 2011)**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SIQUEIRA, D. S. et al. Antibacterial Activity of Monoterpenes (R) - (+) - Citronellal and (S) - (-) - Citronellal against *Escherichia coli* Strains. **Ijppr.Human**, v. 15, n. 1, p. 314-323, 2019.

TEIXEIRA, A. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I, II e III de Lippia alba (Mill.) N. E. Brown**. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

TOMAZ, M.A. et al. Chemical Composition and Allelopathic Activity of the *Eucalyptus* Essential Oil. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 475-483, 2014.

XU, Liangfei; SUN, Xiaoxi; MA, Xiaoling. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v. 16, n. 1, p. 18, 2017.