

Atividade antibacteriana de citronelal e citronelol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de ESBL

Antibacterial activity of citronellal and citronelol against strains of *Escherichia coli* ESBL producers
Actividad antibacteriana de citronelal y citronelol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de ESBL

Dijaci Santos de LIMA¹
Maria Alana Neres de PONTES²
Francisco Patricio de ANDRADE JÚNIOR³
Bernadete Helena Cavalcanti dos SANTOS⁴
Wylly Araújo de OLIVEIRA⁵
Igara Oliveira LIMA⁵

¹Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde, Cuité, Paraíba, Brasil

²Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Campus Cuité

³Mestre e Doutorando pelo Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração em Farmacologia, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

⁴Farmacêutica (Técnica de Nível Superior) na Disciplina de Microbiologia Clínica, Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, João Pessoa, Paraíba, Brasil

⁵Professor(a) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Campus Cuité

Resumo

Introdução: A bactéria *Escherichia coli* é um bacilo Gram negativo que pode causar o desenvolvimento de infecções, principalmente, no trato gastrointestinal, podendo levar os acometidos a óbito. Além disso, houve o surgimento de cepas produtoras de betalactamases de amplo espectro (ESBL), que se caracterizam por apresentarem-se resistentes a diversos β -lactâmicos, sendo necessária a busca por novas substâncias com atividade antibacteriana frente a esses microrganismos. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo estudar a atividade antimicrobiana dos fitoconstituintes citronelal e citronelol contra cepas de *Escherichia coli* ESBL através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). **Materiais e métodos:** A determinação da CIM dos fitoconstituintes selecionados foi realizada pela técnica da microdiluição seriada a uma razão de dois, reservando a última coluna para o controle do crescimento dos microrganismos. **Resultados:** A CIM do citronelol apresentou concentrações de 256 $\mu\text{g/ml}$ para as cepas C-18, 65, 21 e C-20, e 512 $\mu\text{g/ml}$ para as cepas C-24, C-25, 24 e 45. Já frente à ação do citronelal não se foi possível a obtenção da CIM nas concentrações testadas. **Conclusão:** Através dos experimentos pôde-se afirmar que o fitoconstituente citronelol exerce atividade bacteriostática sobre as cepas de *Escherichia coli* e que o fitoconstituente citronelal não possui atividade antibacteriana nas concentrações testadas.

Descritores: *Escherichia coli*; Antibacterianos; Terpenos; Farmacologia.

Abstract

Introduction: The bacterium *Escherichia coli* is a Gram negative bacillus that can cause the development of infections, especially in the gastrointestinal tract, which can lead to death. In addition, there was the emergence of broad spectrum beta-lactamase producing strains (ESBL), which are characterized by being resistant to several β -lactams, requiring the search for new substances with antibacterial activity against these microorganisms. **Objective:** This work aims to study the antimicrobial activity of phytochemicals citronellal and citronelol against strains of *Escherichia coli* ESBL through determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). **Material and methods:** The determination of the MIC of the selected phytochemicals was performed by the technique of serial microdilution in a ratio of two, reserving the last column to control the growth of microorganisms. **Results:** The CIM citronelol showed concentrations of 256 $\mu\text{g/ml}$ for C-18 strains, 65, 21, C-20 and 512 $\mu\text{g/ml}$ for the strains C-24, C-25 and front 24 and 45. Since the action of citronelol not been possible to obtain the CIM at the concentrations tested. **Conclusion:** Through the experiments could be said that the citronelol fitoconstituente has bacteriostatic activity against the strains of *Escherichia coli* and the citronelal fitoconstituente not have antibacterial activity in the tested concentrations.

Descriptors: *Escherichia coli*; Anti-Bacterial Agents; Terpenes; Pharmacology.

Resumen

Introducción: La bacteria *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo que puede causar el desarrollo de infecciones, especialmente en el tracto gastrointestinal, que puede conducir a la muerte. Además, surgieron cepas productoras de betalactamasas de amplio espectro (BLEE), que son resistentes a varios β -lactámicos, así es necesaria la búsqueda de nuevas sustancias con actividad antibacteriana contra estos microorganismos. **Objetivo:** El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la actividad antimicrobiana de los fitoconstituyentes citronellal y citronelol contra cepas de ESBL de *Escherichia coli* mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). **Materiales y métodos:** La determinación de la CIM de los fitoconstituyentes seleccionados se realizó mediante la técnica de microdilución en serie en una proporción de dos, reservando la última columna para controlar el crecimiento de microorganismos. **Resultados:** Citronelol MIC presentó concentraciones de 256 $\mu\text{g/ml}$ para las cepas C-18, 65, 21 y C-20 y 512 $\mu\text{g/ml}$ para las cepas C-24, C-25, 24 y 45. La acción de citronelal no fue posible obtener la MIC a las concentraciones probadas. **Conclusión:** A través de los experimentos, se puede afirmar que el fitoconstituente del citronelol ejerce actividad bacteriostática en las cepas de *Escherichia coli* y que el fitoconstituente del citronelal no tiene actividad antibacteriana en las concentraciones probadas.

Descriptores: *Escherichia coli*; Antibacterianos; Terpenos; Farmacología.

INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli* é um bacilo Gram negativo que pode ser encontrado comumente na região intestinal de animais, incluindo seres humanos, ou ser adquirida através da ingestão de alimentos e água contaminados ocasionando no surgimento de diversas doenças, principalmente, no trato gastrointestinal, podendo levar o acometido a óbito¹.

Infecções geradas por este microrganismo, há décadas atrás, eram combatidas através da utilização de cefalosporinas, contudo após o surgimento de cepas produtoras de betalactamases de amplo

espectro (ESBL), o uso desses fármacos tornou-se ineficaz²⁻⁴, observando-se que somente alguns antimicrobianos β -lactâmicos conservam sua atividade frente a cepas produtoras de ESBLs^{2,5,6}.

Devido à inefetividade das principais formas de tratamento contra infecções bacterianas de cepas produtoras de ESBL, pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de investigar novos fármacos com ação antimicrobiana, em que se pode constatar grande potencial dos produtos naturais como possíveis agentes antibacterianos^{7,8}, a exemplo dos terpenos.

Os terpenos e seus derivados estão geralmente associados aos óleos essenciais, se caracterizando por serem compostos voláteis formados por unidades de isopreno (C_5H_8)_n e que apresentam diversas funções químicas orgânicas, como ácidos, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outros. Dentre os diversos terpenos, é possível destacar citrionelol e citrionelal que são formados por duas unidades de isopreno e possuem a função orgânica álcool e aldeído, respectivamente⁹.

O citrionelol está presente em óleos essenciais de algumas plantas medicinais como *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus* e *Lippia alba*¹⁰, enquanto que o citrionelal pode ser encontrado em óleo essencial de *Cymbopogon nardus*¹¹. Ambos os monoterpenos têm sido investigados frente a sua atividade bactericida e/ou bacteriostática, entretanto nota-se escassez de estudos quanto ao seu potencial antibacteriano frente cepas produtoras de ESBL.

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar, através do método de microdiluição em caldo, a atividade antibacteriana de citrionelal e citrionelol frente a cepas de *Escherichia coli* produtoras de ESBL.

MATERIAL E MÉTODO

○ Cepas bacterianas e fitoconstituintes

Foram utilizadas as cepas bacterianas de *E. coli* ESBL C-18, 65, C-21, C-20, C-24, C-25, 24 e 45 e os fitoconstituintes testados foram o citrionelal e o citrionelol adquiridos através da empresa *Sigma Aldrich*.

○ Inóculo

O inóculo foi ajustado de acordo com a escala de 0,5 Mc Farland em uma suspensão composta pela bactéria e por solução salina à 0,85%.

○ Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM dos fitoconstituintes selecionados foi realizada pela técnica da microdiluição em placa de 96 cavidades e fundo em “U” para cada uma das cepas. Através da diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas as concentrações de 1024 a 32 µg/mL, efetuadas na própria placa, da coluna A até a F. As duas últimas colunas (G e H) foram reservadas para o controle de crescimento do microrganismo (caldo *Müller Hinton*, sem o produto testado). Foram realizados os seguintes controles: controle para observar a viabilidade da cepa (caldo e cepa) e controle de esterilidade (caldo)¹²⁻¹⁴.

Em seguida, adicionou-se 10µL do inóculo (bactéria a 0,5 McFarland) em cada uma das cavidades. O ensaio foi realizado em triplicata e incubado a 37°C no período de 24 horas para *E. coli*. Após o tempo de incubação adequado, 20 µL resazurina a 1% (SIGMA), indicador colorimétrico de óxido-redução para bactérias, foi adicionado e a

leitura procedida, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo através da observação da mudança da coloração da solução de azul para rosa/vermelho, resultante do crescimento do microrganismo. Portanto, foi determinada como CIM, a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento do microrganismo ensaiado¹²⁻¹⁴.

RESULTADOS

Os resultados referentes à ação bacteriostática do citrionelol contra cepas de *E. coli* se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM em µg/ml) do citrionelol contra cepas de *E. coli*

Cepas	Controle Positivo	Citrionelol (µg/mL)
C-18	+	256
65	+	256
21	+	256
C-20	+	256
C-24	+	512
C-25	+	512
24	+	512
45	+	512

+Crescimento Bacteriano
Fonte: Dados da Pesquisa

Na Tabela 2 pode-se observar que não se foi possível à obtenção da CIM nas concentrações testadas do citrionelal.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM em µg/ml) do citrionelal contra cepas de *E. coli*

Cepas	Controle Positivo	Citrionelal (µg/mL)
C-18	+	> 1024
65	+	> 1024
21	+	> 1024
C-20	+	> 1024
C-24	+	> 1024
C-25	+	> 1024
24	+	> 1024
45	+	> 1024

+Crescimento Bacteriano
Fonte: Dados da Pesquisa

DISCUSSÃO

Os valores de CIM do citrionelol variaram entre 256 µg/ml a 512 µg/ml, enquanto que o citrionelal não apresentou valores de CIM nas concentrações testadas.

Para produtos naturais, evidencia-se que fitoconstituintes que apresentem CIM de 50 a 500 µg/ml são de ótima atividade, 600 a 1500 µg/ml de atividade moderada e superior a 1500 µg/ml considera-se de fraca atividade¹⁵. Assim, pode-se evidenciar que o fitoconstituente citrionelol apresentou atividade ótima para todas as cepas investigadas. Corroborando com os resultados encontrados acerca do citrionelal, em um estudo realizado com cepas *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL, observou-se que não houve a inibição do crescimento em nenhuma das concentrações (32 a 2048 µg/ml) testadas pelos pesquisadores¹⁶.

Entretanto, tal achado não significa que o citrionelal não apresente potencial antimicrobiano, podendo ser ativo frente a outros microrganismos, contudo neste estudo não apresentou atividade antibacteriana nas condições avaliadas. Ademais, é interessante que haja a aplicação de outras metodologias que permitam maior exploração desse

possível potencial, como por exemplo, estudos de associação com fármacos utilizados na prática clínica ou outros produtos naturais, o que por sua vez, podem contribuir para a diminuição da concentração de ambos os fármacos ou ainda permitir a diminuição da seleção de cepas resistentes.

Diferindo dos resultados obtidos com o citronelol, observou-se em estudo realizado com as bactérias *Streptococcus mutans*, *S. oralis* e *S. salivarius* que o valor de CIM foi de 625 µg/ml¹⁷. Em pesquisa realizada com cepas de *Trichophyton rubrum* notou-se que o valores de CIM para citronelol variaram entre 8 a 1024 µg/ml¹⁸. Enquanto que em estudo com *Cladosporium* spp., resultados semelhantes foram encontrados, em que a CIM variou entre 256 a 512 µg/ml¹⁹.

A atividade antibacteriana obtida a partir do monoterpeno citronelol, pode estar relacionada a sua característica química hidrofóbica que, por sua vez, permite a adesão a lipídios da membrana celular e possível mudança de permeabilidade e integridade de membrana²⁰, causando portanto a morte do microrganismo.

Não obstante, é válido destacar que este é o primeiro estudo que busca evidenciar a atividade antimicrobiana de citronelol e citronelal frente a cepas de *E. coli* produtoras de ESBL, podendo, portanto, servir como material de apoio para o desenvolvimento de novos estudos que possuam a mesma temática como foco central.

CONCLUSÃO

Por meio da técnica de microdiluição e levando em considerações as condições experimentais aplicadas e as cepas testas, observou-se que somente o monoterpeno citronelol apresentou atividade bacteriostática. Entretanto, a não evidencição de atividade antibacteriana para o citronelal não significa que o mesmo não apresente possíveis atividades biológicas interessantes frente a microrganismos, sendo necessários outros estudos com a aplicação de outras técnicas para se caracterizar melhor o seu possível potencial.

REFERÊNCIAS

1. Souza CO, Melo TRB, Melo CSB, Menezes EM, Carvalho AC, Monteiro LCR. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreioagênica versátil. *Rev Pan-Amaz Saúde*. 2016;7(2):79-91.
2. Lago A, Fuentefria SR, Fuentefria DP. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(4):430-34.
3. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria. *J Glob Infect Dis*. 2010;2(3):263-74.
4. Rath S, Dubey D, Sahu MC, Padhy RN. Surveillance of ESBL producing multidrug resistant *Escherichia coli* in a teaching hospital in India. *Asian Pac J Trop Dis*. 2014;4(2):140-49.
5. Song KH, Joen JH, Park WB, Park SW, Kim HB, Oh MD, et al. Clinical outcomes of spontaneous bacterial peritonitis due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: A retrospective matched case-control study. *BMC Infect Dis*. 2009;9.
6. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(3):159-66.
7. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. In vitro interference of *Momordica charantia* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides. *Pharm Biol*. 2008;47(11):1056-59.
8. Veras HNH, Rodrigues FFG, Botelho MA, Menezes IRA, Coutinho HDM, Costa JGM. Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;10(Sup 2):2790-95.
9. Felipe LO, Bicas JL. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Quím Nova Esc*. 2017;39(2):120-30.
10. Bastos JF, Moreira IJ, Ribeiro TP, Medeiros IA, Antonioli AR, Sousa DP, et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;106:331-37.
11. Castro HG, Perini VBM, Santos GR, Leal TCAB. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. *Rev. Ciênc. Agron*. 2010;41(2):308-14.
12. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos para Bactérias de Crescimento Aeróbio: Norma Aprovada. 6nd ed. Pennsylvania: CLSI; c2005. 53 p.
13. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007;42(4):321-24.
14. Hussain AI, Anwar F, Nigam OS, Sarker SD, Moore JE, et al. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *Food Sci Technol*. 2011; 44(4):1199-206.
15. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol*. 2004;35(4):275-80.
16. Ponte MAN, Lima DS, Gomes SM, Santos BHC, Lima IO. Efeito inibitório de monoterpenos frente a *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. *R Bras Ci Saúde*. 2018;22(1):51-6.

17. Ferreira GLS, Bezerra LMD, Ribeiro ILA, Morais Júnior RCD, Castro RD. Susceptibility of cariogenic microorganisms to phytoconstituents. *Braz J Biol.* 2018;78(4):691-96.
18. Pereira FO, Mendes JM, Lima IO, Mota KS, Oliveira WA, Lima EO. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharm biol.* 2015;53(2):228-34.
19. Santos AS, Silva GS, Silva KVS, Lima MIO, Arrua JMM, Lima EO, et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol against food-relevant dematiaceous fungi *Cladosporium* spp. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2017;76:1-8.
20. Kaur S, Rana S, Singh HP, Batish DR, Kohli RK. Citronellol disrupts membrana integrity by inducing free radical generation. *Z Naturforsch C.* 2011;66(5-6):260-66.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Igara Oliveira Lima

Universidade Federal de Campina Grande
igaraolima@gmail.com

Submetido em 25/07/2019

Aceito em 20/04/2020