Bioprospecção da atividade antiaderente do monoterpeno (S)-(-)-Limoneno contra cepa de Pseudomonas aeruginosa

Bioprospecting the anti-adherent activity of the monoterpene (S)-(-)-Limonene against a strain of *Pseudomonas aeruginosa*

***Maria Alice Beserra Barbosa*[1]**
***Bernadete Santos*[2]**
***Mylena Medeiros Simões*[3]**
***Maria Alice Araújo de Medeiros*[4]**
***João Henrique Anizio de Farias*[5]**
***Millena de Souza Alves*[6]**
***Abrahão Alves de Oliveira Filho*[7]**

RESUMO: A resistência bacteriana será o principal fator causal nas taxas de mortalidade em 2050 segundo previsões da OMS, tornando uma necessidade a testagem de novos compostos, dentre eles destacam-se os produtos naturais como óleos essenciais e seus derivados, que tem sido testados em experimentos que corroboram suas múltiplas potencialidades frente a esta questão emergente. Dessa forma, a presente pesquisa buscou avaliar a atividade antiaderente do monoterpeno (S)-(-)-limoneno contra a *Pseudomonas aeruginosa*. A substância testada, oriunda da Indústria Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP), foi submetida a processos metodológicos para determinação da concentração inibitória mínima de aderência (CIMA), utilizando meio nutritivo sacarosado a 5% e diluições da proporção de 1:1 até 1:128 correspondentes ao monoterpeno puro, para o controle positivo empregou-se o digluconato de clorexidina a 0,12%. O resultado da CIMA demonstrou que o monoterpeno (S)-(-)-limoneno apresentou eficácia antiaderente na proporção de 1:1, enquanto que o do controle foi de 1:4, no entanto mais experimentos precisam ser realizados para identificar o perfil antiaderente do (S)-(-)-limoneno frente a cepa testada.
PALAVRAS-CHAVE: farmacologia, fitoterápicos, resistência bacteriana.

ABSTRACT: Bacterial resistance will be the main causal factor in mortality rates by 2050, according to WHO forecasts, making it necessary to test new compounds, including natural products such as essential oils and their derivatives, which have been tested in experiments that corroborate their multiple potentialities in the face of this emerging issue. This research sought to evaluate the anti-adherent activity of the monoterpene (S)-(-)-limonene against Pseudomonas aeruginosa. The substance tested, from Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP), was subjected to methodological processes to determine the minimum inhibitory concentration of adherence (MIC), using 5% saccharinated nutrient medium and dilutions of 1:1 to 1:128 corresponding to the pure monoterpene, while the positive control was 0.12% chlorhexidine digluconate. The CIMA result for the monoterpene showed that the compound (S)-(-)-limonene showed anti-adherence efficacy at a ratio of 1:1, while the control was 1:4. However, further experiments need to be carried out to identify the anti-adherence profile of (S)-(-)-limonene against the strain tested.
KEYWORDS: pharmacology, herbal medicines, bacterial resistance.

[1] Graduanda em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E-mail: alicealuno.ufcg@gmail.com
[2] Mestranda em Ciência e Saúde Animal - Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E-mail: bernadetes672@gmail.com
[3] Mestranda em Ciência e Saúde Animal - Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E-mail: mylenamedeirossimoes@gmail.com
[4] Doutoranda em Ciência e Saúde Animal-Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E-mail: medeirosallice22@gmail.com
[5] Mestrando em Ciência e Saúde Animal - Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E-mail: henriqueanizio7@gmail.com
[6] Doutoranda em Ciência e Saúde Animal-Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E-mail: millenaasouzaa@gmail.com
[7] Professor Doutor da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). E- mail: abrahao.alves@professor.ufcg.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Em 2050, segundo previsto pela OMS em associação com o governo britânico, a resistência bacteriana será o principal fator causal nas taxas de mortalidade (O'NEILL, 2016), um aspecto preocupante especialmente diante do atual cenário pós-pandêmico, visto que devido à similaridade sintomática entre a COVID-19 e determinadas bacterioses a utilização errônea de antibióticos se intensificou, contribuindo para o uso indiscriminado de tais fármacos e, por conseguinte, para um agravamento à problemática das superbactérias (HUTTNER *et al*., 2020).

Dessa forma, dada a crescente ameaça à saúde humana, a OMS publicou uma lista dos patógenos bacterianos que devem receber prioridade quanto a elaboração e pesquisa de novas substâncias, alocando na categoria crítica microrganismos que oferecem riscos, sobretudo a indivíduos imunissuprimidos, sendo estes *Acinetobacter baumannii,* diversas bactérias da família Enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa* (WHO, 2017).

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa que pode ser encontrada em múltiplos meios, como por exemplo no solo, em vegetais e animais, apresentando resistência a diversas drogas antimicrobianas, inclusive as anteriormente utilizadas no tratamento das suas respectivas enfermidades, possuindo como um dos seus mecanismos de virulência a formação do biofilme, uma estrutura capaz de elevar sua resistência a antibióticos, tornando-a relevante à ação patogênica desta bactéria (CHAVEZ-JACOBO, 2020; VETRIVEL *et al*., 2021).

No Brasil a *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno de importância médica, principalmente devido aos casos relatados em território nacional de *P. aeruginosa* produtoras das enzimas KPC e NDM, que conferem resistência a carbapenêmicos, agregando maior complexidade ao tratamento e elevando os índices de mortalidade, dentre as enfermidades associadas a esta bactéria estão pneumonia hospitalar, infecção urinária e bacteremias (BRASIL, 2021).

Diante disso, a multirresistência tem conduzido a testagem da eficácia de novos compostos em estudos como os realizados por Delgado *et al.* (2018) e Medeiros *et al.* (2023), que abordaram o uso de compostos derivados de plantas no combate a bactérias patogênicas. Dentre tais compostos destacam-se os óleos essenciais, que são provenientes do metabolismo secundário de vegetais, sendo usados para fins terapêuticos devido as diversas propriedades que podem possuir, tais como atividade antiviral e antibacteriana (MAN *et al*., 2019; MA; YAO, 2020).

Os óleos essenciais são constituídos principalmente por terpenos e seus derivados, podendo estes primeiros serem de vários tipos, como os Monoterpenos e os Sesquiterpenos (FELIPE; BICAS, 2017). Dentre os monoterpenos, destaca-se o limoneno, comumente encontrado nos óleos essenciais de frutas cítricas, possuindo os isômeros ópticos (S)-(-)-Limoneno e (R)-(+)-Limoneno, podendo ainda ser encontrado em mistura racêmica (COELHO; VIEIRA, 2019; MACHADO; MARTINS; TONIN, 2014).

Segundo exposto por Gupta, Jeyakumar e Lawrence (2021), o limoneno apresenta potencial inibitório contra a formação do biofilme por determinados microrganismos, apresentando baixa toxicidade, o que torna segura sua utilização para fins terapêuticos, porém seu uso se estende a uma gama ampla de aplicações industriais, estando também presente em produtos com finalidade desengordurante, pesticidas e outros inclusos no ramo alimentício.

Dada a relevância da problemática causada pelas bactérias multirresistentes no âmbito das infecções, esta pesquisa tem como objetivo avaliar a possível atividade antiaderente do monoterpeno (S)-(-)-Limoneno contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa.*

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Ensaios *in vitro*

2.1.1. Substância-teste

O monoterpeno (S)-(-)-Limoneno foi adquirido da Indústria Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP.

2.1.2. Espécies Bacterianas

Para a realização do presente estudo, foi utilizada a cepa clínica Pa 104 da *Pseudomonas aeruginosa* mantida em meio Ágar Muller Hinton (AMH) a uma temperatura de 4 °C, utilizando-se para os ensaios repiques em AMH incubados a 37ºC e diluídos em solução salina estéril, alcançando uma concentração final de 1,5 x 10^8 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), empregando como referência comparativa para ajuste através da turbidez, um tubo 0,5 da escala McFarland. (BONA *et al.,* 2014).

2.1.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência

A Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do monoterpeno (S)-(-)-Limoneno será determinada na presença de sacarose a 5%, de acordo com Albuquerque *et al.* (2010) com modificações, usando-se proporções correspondentes ao composto de 1:1 até a diluição 1:128. A partir do crescimento bacteriano, a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* será cultivada a 37ºC em caldo Mueller Hinton (DIFCO, Michigan, Estados Unidos), depois serão distribuídos 0,9 mL do subcultivo em tubos de ensaio e, em seguida, adicionado 0,1 mL da solução correspondente às diluições do composto. A incubação será feita a 37ºC por 24 horas com tubos inclinados a 30º. A leitura será realizada através da observação visual da aderência da bactéria às paredes do tubo, após a agitação do mesmo. O ensaio será realizado em duplicata. O mesmo procedimento será realizado para o controle positivo, o digluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard®, Colgate-Palmolive Company, Nova York, EUA). Será considerada a CIMA a menor proporção do agente em contato com sacarose que impediu a aderência ao tubo de vidro.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) foi determinada para o monoterpeno (S)-(-)-Limoneno em diferentes proporções e estabelecida como a menor proporção do agente em contato com sacarose que impediu visualmente a aderência da bactéria ao tubo de vidro, conforme apresentado na tabela 1. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, verifica-se que o monoterpeno testado inibiu a aderência da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* na proporção de 1:1, possuindo o potencial antiaderente menor do que o digluconato de clorexidina a 0,12%, que impediu a aderência até a proporção de 1:4.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do monoterpeno (S)-(-)-Limoneno e do digluconato de clorexidina a 0,12% contra a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (Pa 104).

Monoterpeno (S)-(-)-Limoneno							
1:1	**1:2**	**1:4**	**1:8**	**1:16**	**1:32**	**1:64**	**1:128**
-	+	+	+	+	+	+	+
Digluconato de clorexidina a 0,12%							
1:1	**1:2**	**1:4**	**1:8**	**1:16**	**1:32**	**1:64**	**1:128**
-	-	-	+	+	+	+	+

Legenda: (+) Com adesão a parede do tubo (-) Sem adesão a parede do tubo

Fonte: autoria própria.

Segundo estudos analisados por Brito *et al.* (2020), dentre os benefícios da utilização de produtos naturais como uma alternativa terapêutica estão o baixo custo quando comparados aos fármacos alopáticos, a maior facilidade de obtenção em território nacional, tendo em vista a vasta biodiversidade brasileira e a menor incidência de efeitos adversos quando comparados a medicamentos convencionais. A eficácia dessas substâncias é corroborada inclusive pelo sistema único de saúde (SUS), que oferta doze medicamentos de origem fitoterápica (BRASIL, 2022).

Embora estudos que avaliem a concentração inibitória mínima do monoterpeno (S)-(-) –Limoneno sejam escassos na literatura, pesquisas que comprovam o potencial antibacteriano desse composto já foram conduzidas, conforme foi o caso de Vuuren e Viljoen (2007) que apresentaram resultados relevantes quanto aos enantiômeros do limoneno, onde nos resultados relatados as combinações de (+)-limoneno com 1,8-cineol, (-)-limoneno com 1,8-cineol e a combinação dessas duas formas do limoneno com 1,8-cineol contra *P. aeruginosa* (ATCC 9027), apresentaram CIM com valores indicativos de eficácia antimicrobiana.

Outros estudos já demonstraram os efeitos de diferentes monoterpenos com potencial antiaderente contra cepas de *P. aeruginosa*, à exemplo de Bezerra *et al.* (2020), onde o monoterpeno (S)-(-)-citronelal obteve CIM correspondente a 512 μg/mL, caracterizando forte atividade antibacteriana. Nesta mesma pesquisa foi realizada a CIMA, onde o (S)-(-)-citronelal apontou eficácia contra *P. aeruginosa* na proporção de 1:8.

Já na pesquisa de Bezerra *et al.* (2022), o monoterpeno (R)-(+)-citronelal foi testado contra cepas clínicas de *P. aeruginosa,* obtendo como resultado da CIM 512 μg/mL, caracterizando forte atividade antibacteriana. Ademais, tal estudo revelou atividade bactericida da substância frente a maioria das cepas testadas.

3. CONCLUSÃO

Com base nos resultados alcançados, pode-se observar que o (S)-(-)-Limoneno apresentou eficácia antiaderente apenas na maior proporção testada contra a cepa de *P. aeruginosa*. Dessa forma, faz-se necessários estudos mais aprofundados para elucidação de mecanismos e padrões de eficiência e eficácia.

3. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. C. L. de *et al*. Efeito antiaderente do extrato da Matricaria recutita Linn. sobre microorganismos do biofilme dental. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 39, n. 1, p. 21-5, 2010.

BEZERRA, R. V. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do monoterpeno (s)-(-)-citronelal contra cepas de *pseudomonas aeruginosa*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 18, n. 1, p. 507-516, 2020.

BEZERRA, R. V. *et al*. Avaliação da atividade antibacteriana do monoterpeno (r)-(+)-citronelal contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 51, n. 2, p. 691-702, 2022.

BONA, *et al*. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq. Inst. Biol.**, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa n°01/2021. Identificação de Pseudomonas aeruginosa resistente a carbapenêmicos, produtora de KPC e NDM. Brasília (DF); 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/comunicado-de-risco-01_2021-gvims-ggtes_01-09-2021.pdf/view>. Acesso em: 18 ago. 2023

BRASIL. Ministério da Saúde. Relação nacional de medicamentos essenciais, 2022. Disponível em:<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/cbaf/qualifar-sus/arquivos/20210367-rename-2022_final.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2023.

BRITO, V. P. de *et al*. A fitoterapia como uma alternativa terapêutica complementar para pacientes com Diabetes Mellitus no Brasil: uma revisão sistemática. **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**, v. 9, p. 189–204, 2020.

CHAVEZ-JACOBO V. M. La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. **TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas**, v. 23, e20200202, 2020.

COELHO, F. M.; VIEIRA, R. P. simulação de diferentes condições reacionais na polimerização via radicais livres de d-limoneno. *In:* CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2019, Uberlândia. **Anais eletrônicos**. Uberlândia, 2019. Disponível em: <http://www.cobeqic2019.com.br/trabalhosfinais/ERC8.pdf>. Acesso em:16 ago. 2023.

DELGADO, L. A. *et al*. atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto da gossypium hirsutum l. contra pseudomonas aeruginosa. **Revista Uningá**, v. 55, n. 4, p. 80–87, 2018.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

GUPTA, A.; JEYAKUMAR, E.; LAWRENCE, R. Journey of limonene as an antimicrobial agent. **Journal of Pure & Applied Microbiology**, Uttar Pradesh, v. 15, n. 3, p. 1110-1094, 2021.

HUTTNER, B. D. *et al*. covid-19: don't neglect antimicrobial stewardship principles!. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 7, p. 808-810, 2020.

MACHADO, B. R.; MARTINS, J. G.; TONIN, L. T. D. Situação de estudo:“o poder do limoneno” como proposta didática para o ensino de estereoquímica no ensino médio. *In.*

SEMINÁRIO ESTADUAL PIBID DO PARANÁ, 2, Foz do Iguaçu, 2014. **Anais do evento,** Foz do Iguaçú; Unila, p. 2322-2326, 2014.

MA, L.; YAO, L. Antiviral effects of plant-derived essential oils and their components: an updated review. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2627, 2020.

MAN, A. *et al*. Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: a comparative study. **Pathogens**, v.8, n.15, p1-11, 2019

MEDEIROS, M. A. A. *et al*. Evaluation of the antibacterial activity of trans-anethole against *Enterococcus cloaca* e and *Enterococcus faecalis* strains of food origin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, e269245, 2023.

O'NEILL J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations:** the review on antimicrobial resistance chaired. London: AMR; 2016. Disponível em: <https://amr review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2023.

VETRIVEL, A. *et al*. Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation and Its Control. **Biologics**, Basel, v. 1, n. 3, p. 312-336, 2021.

VUUREN, S.F.V.; VILJOEN, A.M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. 6, p. 540–544, 2007.

WHO. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**, Geneva: world health organization, 2017. Disponível em:< https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 08 ago. 2023.