

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
BACHARELADO EM ODONTOLOGIA

DANIELE DE SOUZA SIQUEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MONOTERPENOS  
(R)-(+)-CITRONELAL E (S)-(-)CITRONELAL CONTRA CEPAS DE  
*Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli***

PATOS - PB

2019

DANIELE DE SOUZA SIQUEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MONOTERPENOS  
(R)-(+)-CITRONELAL E (S)-(-)-CITRONELAL CONTRA CEPAS DE  
*Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli***

Trabalho de Conclusão do Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

PATOS - PB

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

S618b

Siqueira, Daniele de Souza

Bioprospecção da atividade antibacteriana dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal contra cepas de Staphylococcus aureus e Escherichia coli. / Daniele de Souza Siqueira. – Patos, 2019.

41f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Odontologia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2019.

“Orientação: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho”.

Referências.

1. Fitoterapia. 2. Microbiologia. 3. Odontologia.
4. Terpenos. I. Título.

CDU 616.314:633.88

DANIELE DE SOUZA SIQUEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS  
MONOTERPENOS (R)-(+)-CITRONELAL E (S)-(-)-CITRONELAL CONTRA CEPAS  
DE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli***

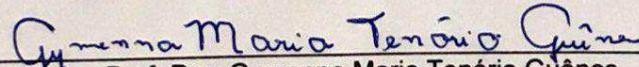
Trabalho de Conclusão do Curso (TCC)  
apresentado à Coordenação do Curso de  
Odontologia da Universidade Federal de  
Campina Grande - UFCG, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira  
Filho

Aprovado em 14/05/19

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho – Orientador  
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Gymenna Maria Tenório Guênes  
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Maria Angélica Satyro Gomes Alves  
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me concedido o dom da vida, sou grata pelas pessoas que fazem parte dela, por ter me permitido conquistar tantas bênçãos, ensinando-me a ser forte, minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Egito Siqueira e Avaneide Luiz, agradeço por tudo que fizeram e fazem por mim, bem como aos meus irmãos, obrigada por terem me dado coragem para seguir, pelas orações e nunca terem desistido. Obrigada por serem tão bons, sempre presentes nos melhores momentos e nos mais difíceis também. Gratidão por terem oportunizado uma educação nas melhores instituições de ensino, assim como, por terem me educado para a vida, reflexo de tudo que aprendi no meu lar. Possuo orgulho de ser filha de um casal tão cheio de amor, com tanto respeito e honestidade, sei que não conseguirei compensar tamanha dedicação, mas prometo levar comigo todos os ensinamentos e me tornar uma pessoa cada vez melhor. Um dia quero poder construir, constituir uma família baseada na que faço parte. Obrigada, Deus.

Aos meus queridos irmãos, Dayane, Bruno e Isabele, unidos constantemente, emanando amor puro e sólido. Aos meus avós paternos José Clementino de Siqueira (in memoria) e Luzia Siqueira (in memoria). Aos meus avós maternos José Luiz e Naide Luiz, em que tenho como exemplo para minha vida.

Aos meus tios e primos que sempre me apoiaram, em especial minha prima Sybelle Siqueira, que sempre se mostrou disponível, pessoa atenciosa com minhas necessidades desde o início da graduação até o último momento no ERI, proporcionando oportunidades, ensinando-me e sendo essencial para a minha vida acadêmica, obrigada a todos que se fizeram presente.

Ao meu namorado Renan, meu amor, parceiro de vida, amigo e confidente. Obrigada por me fazer tão feliz e realizada, por me ajudar e apoiar nas decisões, obrigada por se fazer presente em cada momento na minha vida, pelo cuidado e paciência comigo, sou grata a Deus por ter me escolhido para compartilhar a vida com você.

Deixo minha gratidão a todos os meus amigos, que torcem por mim,

alegrando-se com minhas conquistas. À minha dupla de curso, Elza, devo muito a ela que esteve comigo desde o início, dividindo materiais odontológicos que eu não possuía para as práticas sem sequer ter reclamado, compartilhando seu apartamento nos finais de semana para não ficar sozinha, cuja companhia atuava em benefício uma da outra, seja estudando para as provas ou confortando diante da árdua sólida quando se mora longe da família. Agradeço também a minha amiga Maria que enquanto solteira (agora casada) vivia no meu apartamento, sendo amiga-irmã, comungando de muito estudo, e também de muitas brigas, afinal quem é o(a) irmão/irmã que não briga?!.

Fica meu agradecimento a Joyce, eu carinhosamente nomino como *minha pixesinha*, pessoa com espírito de criança que Deus me presenteou pra cuidar na graduação, a quem ultimamente se fez muito presente na minha vida, juntamente com Edivan, esta que é a pessoa mais engraçada e divertida que eu já conheci, autor dos melhores áudios, os melhores vídeos, as melhores histórias, uma pessoa com o coração gigante, humilde e generoso. Aos meus integrantes do grupo de uma rede social denominada *Veraneio*, além dos já citados até presente momento, Matheus e Lewis, o primeiro mais mentiroso enquanto o segundo mais desmantelado, obrigada pela amizade, pelas montagens, pelas caronas, vocês são "show", espero que Deus me permita conservar todos vocês na minha vida. Obrigada aquelas que conheci no começo de tudo, na UPE, e que ainda hoje se fazem presentes, Danlyne e Izabelly. As minhas amigas de infância, obrigada a todos que contribuíram de alguma maneira para a minha formação.

Ao meu professor e orientador de monitoria, Pivic, Pibic e TCC, Dr. Abrahão Alves, cujas palavras me faltam nesse momento, restando meu agradecimento sincero e perpétuo em razão de tanta oportunidade e confiança a meu favor. Dr. Abrahão, obrigada por ter me ajudado a chegar até aqui, sou grata desde o primeiro momento, quando no segundo período do curso recebi seu acolhimento e confiança, agradeço por ter feito parte do LAFBIM, grupo de pesquisa tão organizado e dedicado. O senhor tem minha admiração. Almejo um dia poder chegar tão longe com tamanha competência, dedicação e amor que o senhor tem pelo o que faz. Obrigada por tudo.

Por fim, deixo meus agradecimentos as professoras da minha banca examinadora, Dra. Angélica e Dra. Gymenna, por terem aceitado o convite para participar desse momento tão especial para mim.

SIQUEIRA, D. S. **Bioprospecção da atividade antibacteriana dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal contra cepas de *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*.** Patos, Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, 2019, 41p.

## RESUMO

Os terpenos constituem um conjunto de substâncias voláteis naturais de origem vegetal e presentes nos óleos essenciais, que são os principais compostos de uso terapêutico, isolados a partir de plantas. O Citronelal é um monoterpeno que ser encontrado na forma de mistura racêmica ou isoladamente. Além disso, estudos já relataram atividades biológicas tais como fungicida e bactericida testadas e comprovadas para o citronelal de mistura racêmica. Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico dos monoterpenos e a importância do combate as infecções causadas pelas bactérias multirresistentes, o presente estudo objetiva avaliar a atividade antibacteriana dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para a realização da atividade foi analisada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Utilizou-se o antibacteriano cloranfenicol como controle positivo. Para isto, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, em uma placa de 96 orifícios, foi adicionado caldo Mueller Hinton e os monoterpenos em estudo nas diferentes concentrações. O ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C durante 24-48 horas para a leitura da CIM. Após a leitura, alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço que não apresentar crescimento bacteriano, e transferidas para poços de uma nova placa, desprovidas de qualquer antimicrobiano. As placas inoculadas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C, e as CBMs são registradas após 48 h. O monoterpeno (S)-(-)-citronelal apresentou uma CIM 50 de 256 µg/mL e CBM 50 de 1024 µg/mL frente as cepas de *E. coli*, já o (R)-(+)-citronelal apresentou a CIM 50 e CBM 50 de 512 µg/mL frente as cepas de *E. coli*. Para as cepas de *S. aureus* ambos os monoterpenos apresentaram o valor de 1024µg/mL para a CIM 50. Com os resultados analisados conclui-se que os monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal podem ser considerados como promissores para o tratamento de muitas enfermidades causadas por bactérias.

**Palavras-chave:** Fitoterapia, Microbiologia, Odontologia, Terpenos.

## ABSTRACT

Terpenes are a group of natural volatile substances of plant origin and present in essential oils, which are the main compounds for therapeutic use, isolated from plants. Citronellal is a monoterpene which is found in racemic mixture form or alone. In addition, studies have reported biological activities such as fungicide and bactericide tested and proven for racemic citronellal. The present study aims to evaluate the antibacterial activity of the monoterpenes (R) - (+) - citronellal and (S) - (-) - Citronellal against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. In order to perform the activity, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were analyzed. The antibacterial chloramphenicol was used as a positive control. For this, the broth microdilution method was used, in a 96-hole plate, Mueller Hinton broth and the monoterpenes under study at the different concentrations were added. The assay was performed in duplicate. Plates were incubated at 37 ° C for 24-48 hours for MIC reading. After reading, aliquots of 20 µL were withdrawn from each well that did not show bacterial growth, and transferred to wells of a new plaque, devoid of any antimicrobial. The inoculated plates were aseptically closed and incubated at 35 ° C, and the MBCs were recorded after 48 h. The (S) - (-) - citronellal monoterpene presented a MIC 50 of 256 µg / mL and CBM 50 of 1024 µg / mL against *E. coli* strains, whereas (R) - (+) - citronellal presented the MIC 50 and CBM 50 of 512 µg / ml against *E. coli* strains. For *S. aureus* strains, both monoterpenes presented a value of 1024 µg / mL for MIC 50. With the results analyzed it is concluded that the (R) - (+) - citronellal and (S) - (-) - citronellal monoterpenes can be considered as promising for the treatment of many diseases caused by bacteria.

**Key words:** Phytotherapy, Microbiology, Dentistry, Terpenes.

## LISTA DE TABELA

### ARTIGO 1

TABELA 1 – Concentração mínima inibitória (CIM) em µg/mL do monoterpeno (S) - (-) - Citronelal contra diferentes cepas de *Escherichia coli*. 25

TABELA 2 – Concentração mínima inibitória (CBM) em µg/mL do monoterpeno (S)-(-)- Citronelal contra diferentes cepas de *Escherichia coli*. 25

TABELA 3 – Concentração mínima inibitória (CIM) em µg/mL do monoterpeno (R)-(+)- Citronelal contra diferentes cepas de *Escherichia coli* 26

TABELA 4 – Concentração mínima inibitória (CBM) em µg/mL do monoterpeno (R) - (+) - Citronelal contra diferentes cepas de *Escherichia coli*. 26

### ARTIGO 2

TABELA 1– Concentração mínima inibitória (CIM) do monoterpeno (R)-(+)-citronelal contra diferentes cepas de *S. aureus*. 31

TABELA 2 – Concentração mínima inibitória (CIM) do monoterpeno (S)-(-)-citronelal contra diferentes cepas de *S. aureus*. 31

TABELA 3 – Concentração bactericida mínima (CBM) do monoterpeno (R)-(+)-citronelal contra diferentes cepas de *S. aureus*. 32

TABELA 4 – Concentração bactericida mínima (CBM) do monoterpeno (S)-(-)-citronelal contra diferentes cepas de *S. aureus*. 32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BioGer	Bioquímica, Genética e Radiobiologia
C	Celsius
<i>C. citratus</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>
<i>C. nardus</i>	<i>Cymbopogon nardus</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSTR	Centro de Saúde e Tecnologia Rural
DBM	Departamento de Biologia Molecular
DMSO	Dimetil-sulfóxido
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de Sódio
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
µg	Microgramas

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	.10
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	.12
<b>3.REFERÊNCIAS</b> .....	.15
<b>4.ARTIGO</b> .....	.20
<b>5.CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	.34
<b>6.ANEXOS</b> .....	.35

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias são micro-organismos patogênicos que ao colonizarem humanos causam infecções, como as da cavidade oral, cada vez mais difíceis de serem tratadas com antibióticos triviais (GONZÁLEZ; MARIOLI, 2010).

Apesar de notáveis os progressos da terapêutica medicamentosa desde o surgimento dos primeiros anti-infecciosos na década de 1930 e 1940, promovendo a redução de morbidade e mortalidade ao longo do século XX (LEITE; VIEIRA; VEBER, 2008), a sua eficácia farmacológica acaba esbarrando na problemática do uso indiscriminado de antibióticos disponíveis comercialmente, conduzindo ao desenvolvimento da resistência bacteriana, estando esta associada à habilidade das bactérias em produzir substâncias que bloqueiam a ação das drogas ou às mudanças nos sítios de ação dos fármacos, além da indução dos efeitos indesejáveis inerentes à antibioticoterapia (CHOMNAWANG et al., 2005; GONZÁLEZ; MARIOLI, 2010; PARK et al., 2004).

A utilização desordenada de antimicrobianos vem sendo uma das preocupações mundiais, constituindo um problema de farmacoeconomia, ao se considerar que, nos países em desenvolvimento 35% do orçamento total da saúde, em média, é gasto com essas drogas (OZKURT et al., 2005).

Em demasia, mais de 50% das prescrições são inadequadas e cerca de 2/3 dos antimicrobianos são utilizados sem prescrição médica, havendo provas, cada vez mais irrefutáveis, de que o mau uso desses medicamentos é o principal responsável pela disseminação da resistência microbiana (BRITO et al., 2007; FISHMAN, 2006; MARCHETE et al., 2011; PASKOVATY et al., 2005).

Portanto, devido à seleção de micro-organismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos já utilizados na terapêutica atual, as pesquisas de inovação tecnológica na área da farmacologia têm visado a descoberta de novos compostos antimicrobianos de origem natural ou sintética, como uma alternativa eficaz e econômica (VARGAS et al., 2004; ELLER et al., 2015).

Dentre os vários produtos naturais e/ou sintéticos bastante pesquisados na farmacologia pode-se citar os composto terpênicos, que são divididos de acordo com o número de carbono (C) em suas moléculas, em isoprenos ou hemiterpenos (5 C), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C); diterpenos (20 C); sesterpenos (25 C);

triterpenos (30 C); tetraterpenos (40 C) e polisoprenóides (n C) (BAKKALI et al., 2008; SPITZER, 2004).

Os monoterpenos, que são os principais constituintes da maioria dos óleos essenciais, compreendem uma série ampla de substâncias naturais e/ou sintéticas que já apresentaram diversas atividades biológicas testadas e confirmadas tais como: fungicida (CÁRDENAS-ORTEGA et al., 2005) e bactericida (CRISTANI et al., 2007).

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico dos monoterpenos e a importância do combate as infecções causadas pelas bactérias multirresistentes, esse trabalho inovador procura avaliar a possível atividade antibacteriana dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

A partir do método de coloração desenvolvido por Hans Christian Gram, em 1884, as bactérias puderam ser classificadas em Gram-positivas, aquelas que se coram em roxo e Gram-negativas, as que apresentam coloração vermelha. Esta técnica tem como fundamento nada mais que a capacidade das células coradas resistirem ou não à descoloração pelo álcool. Por meio dela, permitiu-se uma melhor visualização desses organismos, identificando sua forma e arranjo espacial (SILVA, 2013).

Como exemplos de bactérias Gram-positivas, têm-se as do gênero *Staphylococcus*, distribuídas na natureza, assim como na microbiota normal da pele e da mucosa dos animais e pássaros. Espécies como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus haemolyticus* são frequentemente reconhecidas como agentes etiológicos de infecções como furúnculo, carbúnculo, abscesso, miocardite, endocardite, pneumonia, meningite e artrite bacteriana, constituindo importantes causadoras de infecções hospitalares (COUTINHO et al., 2010; NOSTRO et al., 2004; VERHOEFF et al., 1999).

Dentre as Gram-negativas, a *Escherichia coli* está associada às principais causas de doenças infecciosas humanas, por produzir enterotoxinas cujas propriedades e a associação ao desenvolvimento de diarreias têm sido amplamente investigadas. A atividade das citotoxinas e seu papel na infecção humana já foram identificadas, principalmente em infecções do trato urinário (MARIN; SINHORELLI; MENDES, 2014; MENEZES, et al., 2009; PITOUT, 2012).

De modo geral, os agentes antimicrobianos utilizados para combater as infecções das bactérias tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas podem atuar por vários mecanismos: promovendo modificações na parede celular induzindo alterações da permeabilidade celular, modificações nas moléculas de proteínas e ácidos nucléicos e inibição da síntese de ácidos nucléicos (HENDRA et al., 2011).

No entanto, a elevada atividade metabólica e reprodutiva das bactérias em associação aos mecanismos de troca de material genético pode favorecer o desenvolvimento de múltiplas formas de resistências intrínsecas à estrutura física celular, relacionadas a eventos mutacionais e mesmo à transferência de genes de resistência aos antimicrobianos, para outras bactérias (CLOETE, 2003).

A resistência aos antibióticos é uma preocupação mundial e é quase sempre inevitável consequência de seu uso clínico. Questão essa ainda mais preocupante nos

países em desenvolvimento devido ao frequente irracional uso dessas drogas (GOLD; MOELLERING, 1996; LUJÁN, D; LUJÁN, M; MAMANIC, 2012).

Através de vários mecanismos de resistência o micro-organismo pode resistir total ou parcialmente à ação de um ou mais antimicrobianos pertencentes a mesma ou a diferentes classes terapêuticas (OTAÍZA O'R, 2002). Dessa forma é preocupante o atual quadro de falta de sensibilidade microbiana aos antimicrobianos disponíveis, por isso surge a importância de formas terapêuticas alternativas eficientes (TEXEIRA, 2009).

Assim, com o surgimento de novas doenças e a instalação da resistência às drogas disponíveis comercialmente, tornou-se necessária a busca por fármacos que possuam atividade antimicrobiana e com esta constatação ocorra o desenvolvimento de novos medicamentos (FLORENCE, 2008) e um grande número de pesquisas vem sendo realizadas enfatizando as propriedades antimicrobianas de produtos naturais e/ou sintéticos derivados de vegetais (AGUIAR et al., 2008; LIMA, 2011; SALVAGNINI et al., 2008; SILVA et al., 2008; SIMÕES; ARAÚJO, D; ARAÚJO, R, 2008; TRINDADE et al., 2015).

Os componentes de diferentes óleos essenciais também têm sido estudados por possuírem atividades biológicas. Alguns estudos mostram que monoterpenos apresentam efeitos prejudiciais à membrana celular bacteriana. Estudos de microscopia eletrônica em *E. coli* revelaram perda de material celular, coagulação de constituintes citoplasmáticos, além de estimular a perda de íons potássio e inibir a respiração celular, sugerindo ação letal relacionada a dano de membrana citoplásmica após exposição ao óleo de *Melaleuca alternifolia*, ação essa atribuída a presença do 4-terpinol (CARSON; MEE; RILEY, 2002; COX, 2000; GUSTAFSON, 1998; SOUTHWELL, 1999).

Por serem altamente hidrofóbicos, os monoterpenos interagem com a membrana celular dos microrganismos causando danos importantes na membrana a acabam provocando a lise celular (TURINA, 2006).

Esta classe de metabólitos também se destaca pelas pesquisas científicas abordando os terpenóides na forma de mistura racêmica ou de seus enantiômeros isolados, pois existe uma estreita relação entre a atividade farmacológica e a enantiomeria das substâncias ativas. Essa relação é atribuída à estereosseletividade dos receptores biológicos e das enzimas. Com os avanços das técnicas de separação dos enantiômeros, houve a possibilidade de realização de estudos farmacológicos destes isômeros isolados e da sua mistura racêmica (BIELORY; LEONOV, 2008). Como exemplo destes estudos pode-se citar a pesquisa realizada por Sousa, Nóbrega e Almeida (2007), que demonstrou

as atividades anticonvulsivante, sedativa e analgésica dos enantiômeros do monoterpeno carvona.

Nexte contexto, destaca-se o monoterpeno citronelal, um produto do metabolismo secundário das plantas, que pode ser isolado sob a forma de uma mistura racêmica ou sintetizado sob a forma dos enantiômeros R e S, e encontrado em mais de 50 óleos essenciais de diferentes espécies de plantas (QUINTANS-JUNIOR et al., 2008).

São várias as atividades biológicas descritas para o citronelal (mistura racêmica), entre as quais se destaca seu uso como repelente, uma revisão literária feita por Maia e Moore (2011) demonstra que este monoterpeno aplicado de forma tópica é capaz de repelir insetos durante 4 horas seguidas. Além disso este monoterpeno já revelou ação antimicrobiana (SEIXAS et al., 2011; CAVALCANTI; ALMEIDA; PADILHA, 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). Além disso, a mistura racêmica do citronelal mostrou atividade antifúngica contra cepas do gênero *Candida* spp., isoladas da cavidade oral (TRINDADE et al., 2015).

Estudos com os derivados químicos do citronelal e citronelol, ambos isolados do óleo de citronela, demonstraram boa atividade antimicrobiana na proteção de alimentos contra três importantes bactérias patogênicas *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* (VICTÓRIA et al., 2012), comprovando assim o potencial farmacológico dos monoterpenos contra diferentes espécies de micro-organismos patógenos para o ser humano.

Apesar dos óleos essenciais contendo citronelal serem bastante utilizados para tratarem diferentes condições patológicas de populações disseminadas em todo o mundo, como América do Sul e Ásia, as suas propriedades, em especial antibacteriana dos seus enantiômeros, ainda são pouco estudadas (NERIO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2010)

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D.; NASCIMENTO, S. C.; SENA, K. X. F. R. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 436-440, 2008.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. 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.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.446-475, 2008.

BIELORY, L.; LEONOV, A. Stereoconfiguration of antiallergic and immunologic drugs. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 100, p. 1-9, 2008.

BRITO, D.C.; QUEIROZ, G.; GOMES VALIL, C.; ASSUNÇÃO COSTA, L. Perfil de utilização de antimicrobianos de reserva terapêutica em um hospital privado do Brasil. **Revista de la OFIL (Organización de Farmacéuticos Ibero-latinoamericanos)**, v. 17, p. 9-23, 2007.

BRITO, D. V.; OOTANI, M. A.; RAMOS, A. C. C.; SERTÃO, W. C.; AGUIAR, R. W. S. 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.

CÄRDENAS-ORTEGA, N. C.; ZAVALA-SÄNCHEZ, M. A.; AGUIRRE-RIVERA, J. R.; PEÄREZ-GONZÄLEZ, C.; PEÄREZ-GUTIENÄRREZ, S. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *I Mexicana* Gray. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, p. 4347–4349, 2005.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tee tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 46, p. 1914-1920, 2002.

CAVALCANTI, Y. M.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W.W.N. Screening of essential oils antifungal activity on *Candida* strains. **Odontologia Clínica-Científica**, Recife, p. 243-246, 2011.

CHOMNAWANG, M. T.; SURASSMO, S.; NUKOOKARN, V. S.; GRITSANAPAN, W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 330–333, 2005.

- CLOETE, T. E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, p. 277-282, 2003.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA-JR, J. P.; LIMA, E. O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in ethicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, P. 467–471, 2010.
- COX, S. D. The mode of antimicrobial action of essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170-175, 2000.
- CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four Monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for Their antibacterial activity. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.55, p. 6300–6308, 2007.
- ELLER, S. C. W. S.; FEITOSA, V. A.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M.R. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, n. 1, p. 131-136, 2015.
- FISHMAN, N. Antimicrobial stewardship. **American Journal of Infection Control**, v. 34, p. 55-63; 2006.
- FLORENCE, F.; MARCEL, J.; MARIO, D.; MARC, D. Marine natural products as targeted modulators of the transcription factor NF-kB. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 603-617, 2008.
- GOLD, H. S.; MOELLERING R.C. Antimicrobial-drug resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 19, p. 1445-1453, 1996.
- GONZÁLEZ, M. J.; MARIOLI, J. M. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 104, p. 209-213, 2010.
- GUSTAFSON, J. E. Effects of tea tree oils on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 194-198, 1998.
- HENDRA, R.; AHMAD, S.; SUKARI, A.; SHUKOR, M. Y.; OSKOUFIAN, E. Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruit. **International Journal of Molecular Science**, v. 12, p. 3422-3431, 2011.

LEITE, S. N.; VIEIRA, M.; VEBER, A. P. Estudos de utilização de medicamentos: uma síntese de artigos publicados no Brasil e América Latina. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 793-802, 2008.

LIMA, I. O. **Atividade antifúngica e toxicidade dos monoterpenos citral e carvacrol**. 2011, 125p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Concentração: Farmacologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

LUJÁN, D. A.; LUJÁN, L. M.; MAMANIC, E. Resistência a Antibióticos de Cepas *Escherichia coli* Isoladas de Infecções do Trato Urinário Adquiridas na Comunidade - Cidade de Lima, Peru. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 14, n.1, p. 17-20, 2012.

MAIA, M. F.; MOORE, S. J. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. **Malaria Journal**, v.10, Suppl 1:S11, 2011.

MARCHETE, A. G. G.; MARTINS, B.A.; CORTI, G. S.; BEIJAMINI, V. Análise das prescrições de antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital do Norte do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 91, p. 176-182, 2011.

MARIN, E.; SINHORELLI, J. S. M.; MENDES, A. N. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS ÁGUAS DAS PRAIAS DE PIÚMA, IRIRI E ITAÓCA, ESPÍRITO SANTO. **Revista Saúde e Biologia**, v. 9, p. 43-52, 2014.

MENEZES, K. M. P.; GÓIS, M. A. G.; OLIVEIRA, I. D.; PINHEIRO, M. S.; BRITO, A. M. G. Avaliação da resistência da *Escherichia coli* frente a Ciprofloxacina em uroculturas de três laboratórios clínicos de Aracaju-SE. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.41, n.3, p.239-242, 2009.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, v.101, p.372–378, 2010.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to organo essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 30, p. 191-195, 2004.

OTAÍZA O'R, F. Políticas de control de antimicrobianos en el nivel hospitalario. **Revista Chilena Infectologia**, V. 19, P. 219-221, 2002.

OZKURT, Z.; EROL, S.; KADANALI, A.; ERTEK, M.; OZDEN, K.; TASYARAN, M. A. Changes in antibiotic use, cost and consumption after an antibiotic restriction policy applied by infectious disease specialists. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 58, p. 338-343, 2005.

PARK, J.; LEE, J.; JUNG, E.; PARK, Y.; KIM, K.; PARK, B.; JUNG, K.; PARK, E.; KIM, J.; PARK, D. *In vitro* antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium*. **European Journal of Pharmacology**, v. 496, p. 189-195, 2004.

PASKOVATY, A.; PFLOMM, J. M.; MYKE, N.; SEO, S. K. A multidisciplinary approach to antimicrobial stewardship: evolution into the 21st century. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 1-10, 2005.

PITOUT, J. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. **Expert Review Anti-Infective Therapy.**, v.10, n.10, p.1165-1176, 2012.

QUINTANS-JUNIOR, L. J.; SOUZA, T. T.; LEITE, B. S.; LESSA, N. M.; BONJARDIM, L. R.; SANTOS, M. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ANTONIOLLI, A. R. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. **Phytomedicine**, v.15, p.619–624, 2008.

SALVAGNINI, L. E.; OLIVEIRA, J. R. S.; SANTOS, L. E.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 241-244, 2008.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SEIXAS, T. L.; CASTRO, H.C.; SANTOS, G. R.; CARDOSO, D. P.; Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, Especial, p. 523-526, 2011.

SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, J. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, M. S. V. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 209-212, 2008.

SILVA, J. M. I. **Caracterização morfológica de micobactérias não tuberculosas ambientais por ensaios neutrográficos**. Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Nuclear), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

SIMÕES, C. C.; ARAÚJO, D. B.; ARAÚJO, R. P. C. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 84-89, 2008.

SOUSA, D. P.; NOBREGA, F. F. F.; ALMEIDA, R. N. Influence of the Chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the Central Nervous System: A Comparative Study. **Chirality (New York)**, v. 19, p. 264-268, 2007.

SOUTHWELL, I. A. The search for optimally bioactive Australian tea tree oil. **Acta Horticulturæ**, v. 334, p. 265-275, 1999.

SPITZER, C. M. O. S. V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, p. 467-495.

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.; COSTA, A.V.; RODRIGUES, W.N.; PINHEIRO, P.F.; RINALDO, D.; QUEIROZ, V.T. Chemical Composition and Allelopathic Activity of the *Eucalyptus* Essential Oil. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 475-483, 2014.

TRINDADE, L. A. et al. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. **Clinical oral investigations**, v. 19, n. 9, p. 2223-2231, 2015.

TURINA, A. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p. 101-113, 2006.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p. 159-163, 2004.

VERHOEFF, J.; BEAUJEAN, D.; VLOK, H.; BAARS, A.; MEYLER, A.; WERKWN, V. D. C. A dutch approach to methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 18, p. 461-466, 1999.

VICTORIA, F. N.; RADATZ, C. S.; SACHINI, M.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; MOTTA, A. S.; SILVA, W. P.; LENARDÃO, E. J. Further analysis of the antimicrobial activity of  $\alpha$ -phenylseleno citronelal and  $\alpha$ -phenylseleno citronellol. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 95–99, 2012.

#### 4. ARTIGO

### ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MONOTERPENOS (R)-(+)-citronelal E (S)-(-)-citronelal CONTRA CEPAS DE *Escherichia coli*

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>1</sup>.

<sup>1</sup> Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, Brasil;

<sup>2</sup> Hospital Universitário da Universidade de Ana Bezerra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Santa Cruz-RN, Brasil;

<sup>3</sup> Departamento, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil;

<sup>4</sup> Departamento, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, Brasil

#### RESUMO

Os terpenos constituem um conjunto de substâncias voláteis naturais de origem vegetal e presentes nos óleos essenciais, que são os principais compostos de uso terapêutico, obtidos de plantas medicinais, que possuem uma variedade de compostos bioativos, como os monoterpenos. Neste caso, destaca-se o monoterpeno citronelal, um produto do metabolismo secundário das plantas. Estudos com os derivados químicos do citronelal e citronelol, ambos isolados do óleo de citronela, demonstraram boa atividade alelopática, antioxidante, herbicida, antifúngica e antimicrobiana. Desta forma, o principal objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antibacteriana dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal contra cepas de *Escherichia coli*. Para isto, utilizou-se o método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração bactericida mínima (CBM). Em uma placa de 96 orifícios, foi adicionado caldo Mueller Hinton e o extrato etanólico bruto em estudo nas diferentes concentrações. O ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C durante 24-48 horas. Após a leitura da CIM, alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço que não apresentar crescimento bacteriano, e transferidas para poços de uma nova placa, desprovidas de qualquer antimicrobiano. As placas inoculadas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C, e as CBMs são registradas após 48 h. Na presente pesquisa, observou-se que o monoterpeno em estudo apresentou CBM<sub>50</sub> de 1024 µg/mL e CIM<sub>50</sub> de 256 µg/mL. Com base nesses resultados pode-se afirmar que os monoterpenos possuíam forte efeito antibacteriano frente às cepas de *E. coli*.

**Palavras-chave:** Óleos essenciais. Monoterpenos. Atividade antibacteriana. *Escherichia coli*.

## INTRODUÇÃO

Patógenos de origem alimentar são diversos na natureza e continuam sendo uma das maiores causas de problemas de saúde pública no mundo. São responsáveis por considerável morbidade e mortalidade, custos com cuidados médicos e perda de produtividade <sup>1</sup>.

Doenças infecciosas são causadas por micro-organismos patogênicos (por exemplo, bactérias, vírus, fungos e parasitas) que invadem as células do hospedeiro para a sua reprodução. Essas doenças representam graves problemas de saúde pública que afetam uma fração significativa da população mundial e, em razão de seu aspecto socioeconômico, representam um dos principais desafios para o século XXI, especialmente nas regiões mais pobres e vulneráveis do planeta <sup>2</sup>.

A resistência bacteriana pode causar infecções muito difíceis de serem tratadas, permanecendo no local e favorecendo a proliferação das bactérias. O antibiótico deveria ser prescrito de forma racional, com base em um diagnóstico concreto e não baseado apenas em dados epidemiológicos de determinados agentes etiológicos responsáveis por certas infecções. Porém, o consumo desnecessário e excessivo sem esta cuidadosa avaliação torna mais propício o desenvolvimento desta resistência, tornando-se um problema sério no tratamento das doenças infecciosas. Esse evento ocorre em maior proporção em ambientes hospitalares onde a incidência do uso dessas drogas, é proposta em grande quantidade <sup>3</sup>.

As infecções bacterianas podem ser ocasionadas por diversas espécies, sendo que os principais patógenos encontrados em infecções comunitárias e nosocomiais são *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* <sup>4</sup>.

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa na forma de bastonete e apresenta habitat no trato intestinal. Podem ser imóveis ou móveis por flagelos. A presença de fímbrias e de outras estruturas relacionadas desempenha um papel importante na virulência da bactéria. Alguns estudos mostram que em relação aos problemas causados por ela, destacam-se os principais alimentos como carnes mal cozinhadas, principalmente de origem bovina (hambúrgueres), enchidos curados, sementes de alfafa, sumos de fruta não pasteurizados, queijo curado e leite cru <sup>5</sup>.

A *E. coli* é provavelmente a bactéria mais estudada e uma das mais comumente isoladas no laboratório clínico de microbiologia. As cepas de *E. coli* biologicamente significantes para o ser humano podem ser classificadas (baseando na genética e critérios clínicos) em 3 grandes grupos: comensais, patogênicas intestinais (entéricas ou diarreicas) e patogênicas extra intestinais <sup>6</sup>.

Tendo em vista que bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um desafio no tratamento de infecções, é notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses microrganismos<sup>7</sup>.

Neste contexto e decorrente do uso etnomedicinal, a fitoterapia é amplamente praticada. Entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população poucas têm ação comprovada. Contudo, o uso popular tradicionalmente consolidado tem sido utilizado como guia para pesquisas farmacológicas<sup>8,9</sup>.

As plantas medicinais têm chamado a atenção de pesquisadores, por ser uma fonte promissora de substâncias que podem ser utilizadas no controle de micro-organismos. Na literatura há diversos estudos demonstrando seus efeitos, em particular, antimicrobianos sobre uma grande diversidade de micro-organismos, além de apresentarem um tratamento eficaz sobre algumas cepas resistentes<sup>10</sup>.

Óleos essenciais são produtos resultantes do metabolismo secundário das plantas, podendo ser extraídos por todos os órgãos, como brotos, folhas, flores, caules, galhos, raízes e sementes e são armazenados em células secretoras, epidérmicas e tricomas. Eles têm ganhado cada vez mais notoriedade e despertado interesse, dentre pesquisadores do mundo todo, devido as suas inúmeras propriedades<sup>11</sup>.

Representante de uma classe de metabólitos secundários, os monoterpenos são os constituintes de óleos essenciais presentes em espécies de plantas aromáticas. Sua origem Biosintética deriva de unidades isoprenica, as quais são constituídas por dez unidades de carbonos<sup>12</sup>.

O Citronelal também pertencente ao grupo dos álcoois monoterpenoides e é o principal componente nas misturas de compostos químicos terpenoides, dando ao óleo de citronela o seu aroma característico de limão acentuado<sup>11</sup>.

Sendo uma das substâncias majoritárias de óleos essenciais de plantas aromáticas<sup>13</sup>, o Citronelal revelou ter inúmeras atividades, dentre elas, podemos exemplificar ação antimicrobiana<sup>14</sup>, alelopática, antioxidante<sup>15</sup>, herbicida<sup>16</sup> e atividade inseticida e repelente<sup>17</sup>.

Por outro lado, devido ao desconhecimento da possível existência da ação tóxica, bem como de sua indicação adequada, as plantas medicinais são muitas vezes usadas de forma incorreta, não produzindo o efeito desejado<sup>18</sup>.

Desta forma, com base nas informações sobre o potencial terapêutico dos monoterpenos e a importância do combate às infecções causadas pelas bactérias multirresistentes, esse trabalho inovador procura avaliar a possível atividade antibacteriana dos monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-Citronelal contra cepas de *Escherichia coli*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local de Trabalho

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), estado da Paraíba, Brasil.

#### 2.1 Ensaio in vitro

##### 2.1.1 Fito-constituente

Os monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-Citronelal foram adquiridos 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).

##### 2.1.2 Espécie Bacteriana e Meio de cultura

Foram utilizadas bactérias Gram-negativas sendo elas: *Escherichia coli* ATCC 8539, *Escherichia coli* 101, *Escherichia coli* 102, *Escherichia coli* 103, *Escherichia coli* 104, previamente isoladas, identificadas e 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.

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<sup>19,20</sup>.

##### 2.1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima dos monoterpenos foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo<sup>19,20</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, foram adicionados 10 µL do inóculo de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL da espécie bacteriana nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa de bactéria, especificamente.

Paralelamente, foi realizado o mesmo ensaio com o antibacteriano cloranfenicol na concentração de 100 µg/mL. 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 serão 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 - 48hrs para ser realizada a leitura. A CIM para o monoterpeno e o antibacteriano será 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.

#### 2.1.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

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 Mueller-Hinton (100 µl / 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>21,22</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados referentes à ação antibacteriana do (S)-(-)-citronelal contra cepas de *E. coli* encontram-se na tabela 1 e 2, em que se determinou a CIM<sub>50</sub> do (S)-(-)-Citronelal como sendo 256 µg/mL para as cepas testadas. Já para o CBM, foi determinada como 256 µg/mL para a cepa *Escherichia coli* 104; 512 µg/mL para a cepa *Escherichia coli* ATCC 8539; 1024 µg/mL para as cepas *Escherichia coli* 101 e *Escherichia coli* 102 e sem atividade para a cepa *Escherichia coli* 103.

Os resultados referentes à ação antimicrobiana do (R)-(+)-citronelal contra cepas de *E. coli* encontram-se na tabela 3 e 4, em que se determinou a CIM<sub>50</sub> como sendo 512 µg/mL. A CBM variou de 256 µg/mL a 512 µg/mL para as cepas de *E. Coli* 101 e 104, respectivamente, as demais não apresentaram atividade.

**Tabela 1** – Concentração mínima inibitória (CIM) em µg/mL do monoterpeno (S) - (-) - Citronelal contra diferentes cepas de *Escherichia coli*.

(S)-(-)-Citronelal					
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8539	<i>Escherichia coli</i> 101	<i>Escherichia coli</i> 102	<i>Escherichia coli</i> 103	<i>Escherichia coli</i> 104
512µg/mL	+	+	+	+	+
256 µg/mL	+	+	+	-	+
128 µg/mL	+	-	-	-	+
Controle negativo	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+

(-) Sem inibição (+) inibição

Fonte: autoria própria

**Tabela 2** – Concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL do monoterpeno (S) - (-) - Citronelal contra diferentes cepas de *Escherichia coli*.

(S)-(-)-Citronelal					
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8539	<i>Escherichia coli</i> 101	<i>Escherichia coli</i> 102	<i>Escherichia coli</i> 103	<i>Escherichia coli</i> 104
1024µg/mL	+	+	+	-	+
512 µg/mL	+	-	-	-	+
256µg/mL	-	-	-	-	+
Controle negativo	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	-	+

(-) Sem inibição (+) inibição

Fonte: autoria própria

**Tabela 3** – Concentração mínima inibitória (CIM) em µg/mL do monoterpeneo (R) - (+) - Citronelal contra diferentes cepas de *Escherichia coli*.

(R) - (+) - Citronelal					
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8539	<i>Escherichia coli</i> 101	<i>Escherichia coli</i> 102	<i>Escherichia coli</i> 103	<i>Escherichia coli</i> 104
1024 µg/mL	+	+	+	+	+
512 µg/mL	+	+	-	-	+
256 µg/mL	-	+	-	-	+
128 µg/mL	-	-	-	-	-
Controle negativo	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+

(-) Sem inibição (+) Inibição

Fonte: autoria própria

**Tabela 4** – Concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL do monoterpeneo (R)- (+) - Citronelal contra diferentes cepas de *Escherichia coli*

(R)- (+) - Citronelal					
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8539	<i>Escherichia coli</i> 101	<i>Escherichia coli</i> 102	<i>Escherichia coli</i> 103	<i>Escherichia coli</i> 104
1024 µg/mL	-	+	-	-	+
512 µg/mL	-	+	-	-	+
256 µg/mL	-	+	-	-	-
Controle negativo	-	-	-	-	-
Controle positivo	-	+	-	-	+

(-) Sem inibição (+) Inibição

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<sup>23</sup>.

Sendo assim, de acordo com os resultados dos monoterpeneos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal, podem ser considerados fortes inibidores frente às cepas *Escherichia coli*, uma vez que apresentou

uma CIM<sub>50</sub> (Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das cepas) de 512 µg/mL e 256 µg/mL, respectivamente.

De acordo com Hafidh et al. (2011) 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. Analisando os resultados do CBM pode-se ver que para o monoterpene (R)-(+)-citronelal, a substância teve um efeito bactericida, já para o (S)-(-)-citronelal, a substância possuiu um efeito bacteriostático frente às cepas de *E. coli* <sup>24</sup>.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os dados obtidos com a mistura racêmica do monoterpene Citronelal, que revelou ter inúmeras atividades, dentre elas, ação antimicrobiana <sup>14</sup>.

## CONCLUSÃO

Em vista dos resultados obtidos, pôde-se observar que os monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal apresentaram resultados relevantes. Diante disso, podem ser considerados como promissores para o tratamento de muitas enfermidades causadas pela bactéria *E. coli*, no entanto faz-se necessário estudos mais aprofundados para elucidação de mecanismos e padrões de eficiência e eficácia.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos companheiros do Laboratório de fitoterapia, bioquímica e microbiologia da UFCG (LAFBIM – UFCG) pelo incentivo e grande apoio com a manipulação do material para a realização deste trabalho, ao laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia da UFPB (BioGer - UFPB) por nos ter cedido as bactérias do estudo e ao Prof. Abrahão, pela orientação e seu grande desprendimento em nos ajudar.

## REFERÊNCIAS

1. Balter S. Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 2003.
2. WHO. The Global Burden of Disease in 2004. Geneva: World Health Organization; 2008.
3. Del Fiol FS, Lopes LC, Toledo MI, Barberato-Filho S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43: 68-72.
4. Rodrigues FJB, Barroso APD. Etiologia e sensibilidade bacteriana em infecções do tracto urinário. *Rev Port Saúde Pública.* 2011;29(2):123-131.

5. Bactéria Patogénica - *Escherichia coli*. Quali.pt. 23/03/2008. Available from: <http://www.quali.pt/microbiologia/478-escherichia-coli>
6. Johnson JR, Stell AL. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *J Infect Dis.* 2000;181(1):261-272.
7. Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Smânia Júnior A et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(3):367-373.
8. Elisabetsky E. Pesquisa em plantas medicinais. *Ciênc Cult.* 1987;39:607-702.
9. Sinha Babu SP, Sarkar D, Ghosh NK, Saha A, Sukul NC, Bhattacharya S. Enhancement of Membrane Damage by Saponins Isolated from *Acacia auriculiformis*. *Jpn J Pharmacol.* 1997;75(4):451-454.
10. Anibal P. Potencial de ação antimicrobiana in vitro de extratos de plantas na inibição de *Candida spp*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba; 2007.
11. Carneiro JNP, Albuquerque RS, Leite NF, Machado AJT, Brito DIV, Rolón M. Avaliação da atividade tripanocida, leishmanicida e citotóxica do geraniol e citronelal. *Cad Cult e Ciênc.* 2015;13(2):29-36.
12. Souza MTS, Guimarães AG, Araujo AAS, Quintans Júnior LJ. Monoterpenes With Anti-Inflammatory Activity: Technological Forecasting. *Rev Ge In Tec.* 2014;4(2):867-875.
13. Santos MRV, Moreira FV, Fraga BP, Souza DP, Bonjardim LR, Quintans-Junior LJ. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. *Rev Bras Farmacogn.* 2011; 21(4):764-771.
14. Cavalcanti YW, Pérez ALAL, Xavier GDR, Almeida LFD. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre microrganismos do canal radicular. *Rev Odontol UNESP.* 2011;40(5):208-214.
15. Andrade MA, Cardoso MG, Batista LR, Mallet ACT, Machado SMF. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Rev Ciênc Agron.* 2012;43(2):399-408.
16. Ootani MA, Aguiar RW, Ramos ACC, Brito DR, Silva JB, Cajazeira JP. Use of essential oils in agriculture. *J Biotec Biodivers.* 2013;4(2):162-175.
17. Grisi Laerte, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Caçado PHD et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2014 ;23(2):150-156.
18. Craveiro AA, Fernandes AG, Andrade CHS, Matos FJA, Alencar JW, Machado MIL. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza: UFC; 1981.
19. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. 1st ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: Willians & Wilkins; 1991.
20. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal.* 2000;11(3):137-147.
21. Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Afr J Biotechnol.* 2008; 7(12):1797-1806.
22. 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. *Rev Bio Far.* 2012;8(1):62-70.
23. 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):275-280.
24. Hafidh RR, Abdulmir AS, Vern LS, Abur Bakar F, Abas F, Jahanshiri F, Sekawi Z. Inhibition of Growth of Highly Resistant Bacterial and Fungal Pathogens by a Natural Product. *Open Microbiol J.* 2011;5(1):96-106.

# 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

### RESUMO

*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 objetivo desse 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 isto, utilizou-se o método de microdiluição em caldo para a determinação da CIM e da CBM. Em uma placa de 96 orifícios, foi adicionado caldo Mueller Hinton e o extrato etanólico bruto em estudo nas diferentes concentrações. O ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C durante 24-48 horas. Após a leitura da CIM, alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço que não apresentar crescimento bacteriano, e transferidas para poços de uma nova placa, 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

*Staphylococcus aureus* is a bacterium present in oral infectious diseases, being most commonly found in cases of failure in endodontic treatment, contributing to the increase of bacterial resistance. The objective of this work was to evaluate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (CBM) of the monoterpenes (R) - (+) -

citronellal and (S) - (-) - citronellal against *S. aureus* strains. For this, the broth microdilution method was used for the determination of MIC and CBM. In a 96-well plate, Mueller Hinton broth and the crude ethanolic extract under study at different concentrations were added. The assay was performed in duplicate. Plates were incubated at 37 ° C for 24-48 hours. After reading the CIM, aliquots of 20 µL were removed from each well that did not show bacterial growth, and transferred to wells of a new plaque, devoid of any antimicrobial. The inoculated plates were aseptically closed and incubated at 35 ° C, and the MBCs were recorded after 48 h. Based on the data obtained it was possible to conclude that the (R) - (+) - citronellal and (S) - (-) - citronellal monoterpenes have a bacteriostatic effect on *S. aureus* strains.

**KEYWORDS:** Public Health; Microbiology; Monoterpeno

### 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 (espinhas, 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)-(+)-citroneal e (S)-(-)-citroneal contra cepas de *S. aureus*.

## 1. 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)-(+)-citroneal e (S)-(-)-citroneal foram adquiridos 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 será inferior a 0,1% v/v.

### CONTROLE POSITIVO

Foi usado como controle positivo o antimicrobiano Clorfenicol, adquirido da Sigma-Aldrich® (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  $1,5 \times 10^8$  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 Mueller-Hinton (100 µL/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>.

## 2. 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	<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 positive	+	+	+	+	+
Controle negative	-	-	-	-	-

(-) sem inibição (+) inibição

**Tabela 2.** Concentração mínima inibitória (CIM) 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 positive	+	+	+	+	+
Controle negative	-	-	-	-	-

(-) 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 CIM<sub>50</sub>(Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das cepas) de 1024 mg/mL<sup>18</sup>.

#### CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (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

criaram 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	<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	-	-	-	-	-

(-) crescimento (+) inibição

**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	-	-	-	-	-

(-) crescimento (+) 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*.

### 3. 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>.

### 4. CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos foi possível concluir que os monoterpenos (R)-(+)-Citronelal e (S)-(-)-citronelal possuem atividade antimicrobiana sobre as cepas de *S. aureus*. Desse modo 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.

## 5. AGRADECIMENTOS ou FINANCIAMENTO

Agradeço aos meus colegas do grupo de pesquisa, aos funcionários do laboratório de bioquímica da Universidade Federal de Campina Grande, campus Patos, onde este trabalho foi desenvolvido com todo apoio e dedicação, por fim ao meu orientador Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho, pela confiança e oportunidade de aprendizado repassado durante o desenvolvimento deste trabalho

## 6. 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] José Barbas Rodrigues F, Paula Dias Barroso A. 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 antiinflamatória, 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. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in laboratory medicine*. 3rd ed. New York: Williams & Wilkins; 2018. p. 752-783.
- [13] Palomino J, Martin A, Camacho M, et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(8):2720-2722.
- [14] Mann C, Markham J. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils.
- [15] Bresolin T, Cechinel Filho V. Ciências farmacêuticas. Itajai: Ed. da UNIVALI; 2003.
- [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, Jahanshahi 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.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sendo assim, de acordo com os resultados dos monoterpenos, o (R)-(+)-citronelal pode ser considerado um forte inibidor frente às cepas *Escherichia coli*, uma vez que apresentou uma CIM<sub>50</sub> (Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das cepas) de 512 µg/mL. Para a *S. aureus* o composto foi considerado um efeito moderado diante dos resultados, CIM<sub>50</sub> do de 1024 µg/mL. Já o monoterpeno (S)-(-)-citronelal foi forte frente as cepas de *E.coli* (CIM<sub>50</sub> de 256 µg/mL) e moderado para as cepas de *S. aureus* (CIM<sub>50</sub> de 1024 µg/mL).

Em vista dos resultados obtidos, pôde-se observar que o monoterpeno testado apresentou resultados relevantes. Diante disso os monoterpenos (R)-(+)-citronelal e (S)-(-)-citronelal devido ao seu potencial antimicrobiano pode ser considerado um recurso promissor para o tratamento de muitas enfermidades, no entanto faz-se necessário estudos mais aprofundados para elucidação de mecanismos e padrões de eficiência e eficácia.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

**(Normas da revista – International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research)**

## FORMATO DE MANUSCRITO

Todo o manuscrito deve estar em MS WORD.

- **Idioma:** inglês
- **Espaço:** 1,5
- **Tamanho do papel:** A4 (8,5 "X11")
- **Margens:** 1 polegada (todos os lados)

## ORGANIZAÇÃO DO MANUSCRITO

Deve ser organizado na seguinte ordem:

	Conteúdo		Texto	
	Seqüência	Tipo de fonte	Tamanho da fonte	Padronizar
1	Título	Times New Roman	14	Negrito
2	Nome do autor	Times New Roman	12	Normal
3	Afiliação	Times New Roman	10	Normal
4	Abstrato	Times New Roman	12	Normal
5	Palavras-chave	Times New Roman	12	Normal
6	Introdução	Times New Roman	12	Normal
7	Materiais e métodos	Times New Roman	12	Normal
8	Resultado	Times New Roman	12	Normal
9	Discussão	Times New Roman	12	Normal

10	Conclusão	Times New Roman	12	Normal
11	Reconhecimento	Times New Roman	12	Normal
12	Referência	Algarismos arábicos	12	Normal
<b>Cabeçalhos</b>		Times New Roman	12	Negrito
<b>Subtítulos</b>		Times New Roman	12	Negrito
<b>Texto de corpo</b>		Times New Roman	12	Normal

### **Título**

O título deve ser breve, abrangente e descritivo.

### **Autoria**

Cada autor deve fornecer seu nome completo, incluindo seu primeiro nome e sobrenome, seguido de seu endereço. O Autor Correspondente do manuscrito deve ser mencionado a marca estelar em sobrescrito e deve ser mencionada a afiliação dos autores. Além disso, o autor correspondente deve incluir telefone, fax e endereço de e-mail no canto inferior esquerdo da página de título.

Resumo Deve começar em uma nova página após a página de título para distingui-la da Introdução. Os resumos devem refletir brevemente todos os aspectos do estudo. O resumo não deve exceder 250 palavras. Artigos de revisão, trabalhos de pesquisa e comunicações curtas também devem ter um resumo.

### **Palavras-chave**

Abaixo do resumo mencione 4-6 palavras-chave adequadas para indexação. Esses termos estarão no final do resumo. Se possível, as palavras-chave devem ser selecionadas do Index Medicus ou do Excerpta Medica Index.

### **Introdução**

Deve começar em uma nova página e indicar claramente Objetivo, Revisão de Literatura e Objetivo da pesquisa.

### **Materiais e Métodos**

Esta seção deve descrever os materiais e métodos usados no estudo, como ano, local e outros detalhes relevantes. O método estatístico e o nível de significância escolhido devem ser indicados. Inclua detalhes de aprovação ética neste segmento (se houver).

### **Resultado e Discussão**

A seção deve focar no cumprimento dos objetivos mencionados na parte de introdução. Deve conter uma revisão crítica dos resultados do estudo.

### **Conclusão**

Esta seção deve conter apenas resultados significativos da pesquisa.

### **Reconhecimento**

Todos os agradecimentos devem ser digitados em um parágrafo antes da seção de referência (Todas as pessoas que fizeram contribuições significativas para o trabalho de pesquisa devem ser incluídas no Reconhecimento).

### **Referência**

O Estilo Vancouver é o estilo de citação usado por revistas científicas. Ele saiu de uma reunião de editores de revistas médicas em 1978, realizada em Vancouver, BC, e é mantido pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE).

Autor de **livros** iniciais de sobrenome. Título: subtítulo. Edição (se não for a primeira). Lugar da publicação: Publicador: Ano.

Exemplo:

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmacologia. 5ª ed. Edimburgo: Churchill Livingstone; 2003.

### **Revistas**

Autor Sobrenome Iniciais. Título do artigo Título do periódico, abreviado. Data de Publicação: Número do Volume (Número do Problema): Números de Página.

Exemplo:

John JC Inibidores da ECA e AINEs. Med J Euro. 2010; 777: 181–195.

### **Websites**

Autor iniciais do sobrenome (se disponível). Título do site [Internet]. Lugar de publicação: Publisher; Data da Primeira Publicação [Data da última atualização; data citada]. Disponível em: URL

Exemplo:

George Samsung, Rosy Chris. HIV. MediNet. 15/1/2004

Disponível em: <http://www.health.com/article.htm>

### **Se o autor não é conhecido:**

Título da página. Título do site. Última atualização ou data de direitos autorais. URL (data de acesso).

### **Figuras, Imagens e Tabelas**

Figuras, imagens e tabelas devem ser colocadas em local apropriado no manuscrito.

### **Submissão do manuscrito**

Todos os manuscritos devem ser submetidos pelo sistema de submissão on-line ou por e-mail para [editor@humanjournals.com](mailto:editor@humanjournals.com) e [editor.in.chief.international@gmail.com](mailto:editor.in.chief.international@gmail.com) como anexo.

## ANEXO 2

# INSIRA O TÍTULO EM PORTUGUÊS DO ESTUDO ORIGINAL

INSERT TITLE IN ENGLISH

NOME E SOBRENOME DO **AUTOR**<sup>1</sup>, NOME E SOBRENOME DO **AUTOR**<sup>2\*</sup>

---

1. Acadêmico do curso de graduação do curso X da Universidade Y; 2. Professor Doutor, Disciplina X do curso X da Universidade Y.

\* Insira o endereço do autor de correspondência com Rua/ Av. número, bairro, cidade, Estado, Brasil. CEP: 00000-000. [email@mail.com.br](mailto:email@mail.com.br)  
Preferencialmente, o orientador do estudo deverá ser designado para os diálogos com o Corpo Editorial do periódico **BJSCR**, fornecendo preferencialmente seus contatos profissionais

Recebido em xx/xx/201x. Aceito para publicação em xx/xx/201x

## RESUMO

O resumo do manuscrito, em negrito, deve ter no máximo 200 palavras. O resumo deve ressaltar o fator motivador para a redação do trabalho, sendo composto por frases simplificadas (concisas), afirmativas, sem apresentação de itens enumerados com tópicos. Deverá ser redigido em parágrafo único. Símbolos que não sejam comumente utilizados, fórmulas, equações, diagramas, entre outros, devem ser evitados.

**PALAVRAS-CHAVE:** registre de 3 a 5 palavras-chave, separadas por ponto e vírgula (;).

## ABSTRACT

O abstract, sem negrito, deve ser a tradução do resumo; assim, para evitar o retrabalho, faça o abstract apenas após ter finalizado o resumo.

**KEYWORDS:** as keywords, separadas por ponto e vírgula (;) devem ser as palavras-chave traduzidas para o inglês.

## 7. INTRODUÇÃO

Neste item, deve ser abordado o referencial teórico pesquisado para a elaboração do artigo.

Se necessário, o texto poderá ser subdividido por subtítulo(s) sugestivo(s), grafados com alinhamento à esquerda e em negrito e fonte Arial. A introdução deverá ser finalizada com a hipótese e o(s) objetivo(s) do estudo realizado, sem a necessidade de evidenciá-los em subtítulos.

Abaixo segue um modelo de parágrafo para que fique representado o modo de citação no padrão Vancouver, utilizado pelo periódico BJSCR.

Dotter & Judkins (1964)<sup>1</sup>, descreveram pela primeira vez um procedimento de angioplastia com o uso de cateter de dilatação na circulação periférica, antevendo sua aplicabilidade na circulação coronária.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010)<sup>2</sup>, as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, além de contribuir significativamente com altas taxas de morbidade e elevados custos governamentais com saúde, nos dias de hoje<sup>3</sup>.

Apesar de suas limitações, é preciso considerar que os *stents* coronarianos promoveram o maior avanço da cardiologia intervencionista desde a criação da angioplastia coronariana por Andreas Grüntzig em 1979<sup>4</sup>, uma vez que propiciaram uma diminuição significativa de reestenose quando comparados com qualquer outra técnica de intervenção coronariana percutânea<sup>4,5</sup>.

Akira *et al.* (1995)<sup>6</sup> compararam a reestenose após o implante de *stents* em lesões >20 mm, encontrando índices de 24 a 39%, independentes do tipo de *stent*.

## 8. MATERIAL E MÉTODOS

Os autores devem detalhar os recursos materiais e metodológicos utilizados para realização do trabalho. **Abreviaturas:** para unidades de medida, utilize somente as unidades do Sistema Internacional de Unidades (SI). Utilize apenas abreviaturas e símbolos já padronizados, evitando incluí-las no título do manuscrito e no resumo. O termo completo deve preceder a abreviatura quando ela for empregada pela primeira vez, salvo no caso de unidades comuns de medida.

## 9. RESULTADOS

Neste item os autores devem registrar seus dados numéricos. Figuras e Tabelas (se houver) deverão ser inseridas pelos autores no corpo do texto em local onde sua visualização facilite a compreensão do estudo apresentado.

- Se houver Figuras, recomenda-se que sejam coloridas, com numeração arábica progressiva. O título da figura deverá aparecer abaixo desta, seguido pela sua respectiva legenda, em fonte de tamanho 8. As figuras devem possuir resolução suficiente para visualização se a página for ampliada pelo leitor e estar no formato .JPG.

Não serão aceitas imagens fora de foco;

- Se apresentar Tabelas, o título desta deverá ser inserido sobre (acima) da Tabela, com numeração arábica progressiva, indicando, logo abaixo, a fonte da pesquisa (se houver), ou algum item de observação relevante para interpretação de seu conteúdo.

Os resultados apresentados em Tabelas não devem ser repetidos em gráficos, e vice-versa; No texto, a referência às Tabelas ou Figuras deverão ser feitas por algarismos arábicos. Note que não deverá ser feita inserção dos elementos denominando-os como: esquema, diagrama, gráfico etc. **Os elementos gráficos do artigo necessariamente deverão ser chamados de Figura ou de Tabela.**

## 10. DISCUSSÃO

Após a apresentação dos resultados, os autores deverão comentar sobre seus achados experimentais, contextualizando-os com os registros prévios na literatura científica especializada. Note que o item discussão não deve conter reapresentação de resultados, mas tão somente os comentários ou correlações entre os dados apresentados, e/ou entre os dados do estudo com a literatura especializada.

## 11. CONCLUSÃO

O(s) autor(es) deverá(ão) responder de modo afirmativo ou negativo sobre a hipótese que motivou a realização do estudo, por meio do alcance dos objetivos propostos. No último parágrafo, o(s) autor(es) poderá(ão) expressar sua contribuição reflexiva (de cunho pessoal), e/ou versar sobre as perspectivas acerca do estudo realizado. Este item não deve conter referências, pois deve expressar a opinião dos autores, com a devida fundamentação científica.

## 12. AGRADECIMENTOS ou FINANCIAMENTO

O(s) autor(es) deve(m) indicar a(s) fonte(s) de financiamento da pesquisa (agências de fomento, empresas, etc.), agradecer à instituições ou pessoas que viabilizaram o estudo, sem necessariamente apresentarem-se como autores.

## 13. REFERÊNCIAS

Os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o *Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus)*, disponível em <http://www.nlm.nih.gov>. Utilize fonte Times New Roman de tamanho 9. Listar todos os autores quando até três; quando forem quatro ou mais, listar os três primeiros, seguidos de *et al.* (em itálico). As referências são de responsabilidade dos autores e devem estar de acordo com os originais.

**Exemplos de referências:**

LIVROS:

- [1] Vellini-Ferreira F. Ortodontia: diagnóstico e planejamento clínico. 3ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 1999.
- [2] Kane AB, Kumar V. Patologia ambiental e nutricional. In: Cotran RS. Robbins: patologia estrutural e funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

PERIÓDICOS CIENTÍFICOS:

- [1] Ong JL, Hoppe CA, Cardenas HL, *et al.* Osteoblast precursor cell activity on HA surfaces of different treatments. J Biomed Mater Res 1998; 39(2):176-83.

WEBSITES:

- [1] World Health Organization. Oral health survey: basic methods. 4th ed. Geneve: ORH EPID: 1997. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Imunoterapia. [acesso 11 mar. 2012] Disponível em: <http://inca.gov.br/tratamento/imunoterapia.htm>

MONOGRAFIAS, DISSERTAÇÕES E TESES:

- [2] Mutarelli OS. Estudo in vitro da deformação e fadiga de grampos circunferenciais de prótese parcial removível, fundidos em liga de cobalto-cromo e em titânio comercialmente puro. [tese] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2000.

ANAIS DE EVENTOS OU ENCONTROS CIENTÍFICOS:

- [3] Ribeiro A, Thylstrup A, Souza IP, Vianna R. Biofilme e atividade de cárie: sua correlação em crianças HIV+. In: 16ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; 1999; set 8; Águas de São Pedro. São Paulo: SBPqO; 1999.