

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE TERPENOS E
SESQUITERPENOS**

ALINE CRISTINA GUIMARÃES

VILA VELHA
SETEMBRO / 2016

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE TERPENOS E
SESQUITERPENOS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

ALINE CRISTINA GUIMARÃES

VILA VELHA
SETEMBRO / 2016

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

G963a Guimaraes, Aline Cristina.
Atividade antibacteriana de terpenos e sesquiterpenos /
Aline Cristina Guimaraes – 2016.
33 f.: il.

Orientador: Rodrigo Scherer.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Vila Velha, 2016.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Bactéria.
I. Scherer, Rodrigo. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

ALINE CRISTINA GUIMARÃES

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE TERPENOS E
SESQUITERPENOS**

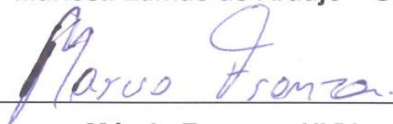
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 30 de setembro de 2016,

Banca Examinadora:



Mariceli Lamas de Araújo – UVV



Márcio Fronza – UVV



Rodrigo Scherer – UVV

Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao seu filho Jesus Cristo! Pelo amparo de todos os dias, pela proteção e pelo presente de ter me concedido chegar até aqui.

A minha melhor amiga Mayara Fumiere Lemos, minha maior incentivadora e amiga que me ajudou a começar e a terminar esse mestrado. Com certeza sem seu apoio, sua força e sua dedicação eu não teria conseguido. Sou imensamente grata, e não tenho palavras para agradecer e espero um dia retribuir.

A minha mãe, Hilda, que sempre me apoiou e dedicou sua vida para me ajudar a ser quem sou hoje. Sei que sem a sua força, apoio e amor eu não teria chegado até aqui. Te amo incondicionalmente e muito obrigada. Você é um exemplo de amor vivo.

Ao Gilvan... por todo amor, apoio, tempo, paciência e força dedicados nesses dois anos. Obrigada por abrir meus olhos e me acordar para realidade, por me alertar e me ensinar muitas coisas. Sou muito grata por toda dedicação e amor.

Aos meus irmãos Helen e Osmino Henrique, pelas palavras de apoio, por acreditar e por me dar forças. Obrigada em especial ao Osmino que me ajudou a cuidar do Teo e Fufu.

A minha tia Cuca e ao meu tio Ismael, que antes mesmo de iniciar no mestrado, me ajudavam com orações para conseguir essa benção.

Ao meu querido orientador Rodrigo Scherer, que foi um exemplo de ser humano. Por nunca ter desistido de mim, nem nos momentos mais difíceis, por todo ensinamento, por toda paciência e por todo amor dedicado a esse trabalho. Que Deus possa lhe retribuir tudo que fez por mim, e eu não tenho palavras para agradecer.

A Lohayne, que esteve ao meu lado no laboratório, sendo meu braço direito e uma super amiga. Sei que não teria conseguido sem você.

As minhas amigas, presentes e distantes, pelas palavras de apoio e por acreditarem em mim. E a todos os colegas do mestrado que de alguma forma me ajudaram.

A UVV por me possibilitar aprendizado e formação.

A Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Espírito Santo – FAPES pela bolsa.

Aos Doutores, Mariceli, Marcio e Denise, pelas contribuições e apoio; João Damasceno, Clarisse e Paulo, obrigada pelo apoio e por me receberem tão bem no laboratório de microbiologia.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei, se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades no impedem de caminhar”. Chico Chavier

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3. RESULTADOS.....	12
4. DISCUSSÃO.....	15
5. CONCLUSÃO.....	17
6. REFERÊNCIAS.....	17

RESUMO

GUIMARÃES, ALINE CRISTINA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, setembro de 2016. **Atividade antibacteriana de terpenos e sesquiterpenos.** Orientador: Rodrigo Scherer.

O objetivo do presente estudo foi investigar as atividades antibacteriana, bactericida e o estudo do tempo de morte de bactérias de 33 terpenos frequentemente reportados no metabolismo secundário de plantas aromáticas. Inicialmente, foi realizada uma triagem nas concentrações 25e 2,5 mM pelo método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* e *S.typhimurium*. Após, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo mesmo método apenas com os compostos que mostraram atividade. A determinação da concentração bactericida mínima e o estudo de tempo de morte (0, 2, 4, 8, 12 e 24 h) foram realizados em placas de petrinhas concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM, onde a redução de $\geq 3 \log_{10}$ UFC da contagem inicial foi definida como efeito bactericida. Dos 33compostos avaliados, dezesseis apresentaram atividade antibacteriana, sendo o timol, carvacrol, citral,carveol, citronelol, geraniol e eugenol aqueles com potencial ação, entretanto, apenas os compostos carveol, citronelol, geraniol, eugenol, e terpineol apresentaram ação bactericida promissora. O eugenol apresentou ação bactericida em apenas duas horas em todas concentrações avaliadas contra *S.typhimurium*. O terpineol apresentou uma redução de 6 \log_{10} UFC na concentração de 2xCIM e de 4xCIM no tempo de 12 horas e 8 horas, respectivamente, para as cepas de *S. aureus*. Na avaliação do tempo de morte das cepas de *E. coli*, os compostos

carveol e citronelol apresentaram rápido efeito bactericida (2 h) na concentração de 4xCIM, enquanto que o gerâniool rápido efeito bactericida (2 h) na concentração de 2xCIM. O presente estudo traz uma valiosa contribuição sobre atividade antimicrobiana dos compostos de metabolismo secundário de plantas, contribuindo dessa forma para uma melhor compreensão da atividade antimicrobiana de óleos essenciais, bem como para encontrar substitutos naturais para os aditivos sintéticos.

Palavras-chave: Óleo essencial, terpenos, bactérias, tempo de morte, atividade antimicrobiana, bactericida.

ABSTRACT

GUIMARÃES, ALINE CRISTINA, M.Sc, University of Vila Velha – ES, september 2016. **Antibacterial activity of terpenes and sesquiterpenes.** Advisor: Rodrigo Scherer.

The aim of this study were to investigate the antibacterial and bactericidal activities and the bacteria 24h-time-kill curve studies of 33 terpenes reported in the secondary metabolism of aromatic plants. Initially, screening was carried out with 25 and 2.5 mM by broth microdilution method in 96-well microplates was evaluated against *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* and *S. typhimurium*. The determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth microdilution method was performed only with compounds that showed activity. The determination of minimum bactericidal concentration and the time-kill study (0, 2, 4, 8, 12 and 24 h) were performed in Petri dishes in concentrations of MIC, 2xMIC and 4xMIC, where the reduction of $\geq 3 \log_{10}$ CFU of the initial count was defined as bactericidal effect. Of the 33 compounds evaluated, seven presented no activity, and 16 showed antibacterial activity in the lower concentration evaluated, and thymol, carvacrol, citral, carveol, citronellol, geraniol and eugenol those with potential action, however, only carveol, citronellol, geraniol, eugenol, and thymol showed promising bactericidal action. Eugenol showed rapid bactericidal action (2 h) in all concentrations evaluated against *S. typhimurium*. Terpineol showed a reduction of 6 \log_{10} CFU at a concentration of 2xMIC and 4xMIC at 12 and 8 hours, respectively, for *S. aureus* strains. The 24h-time-kill studies for *E. coli* strains, the carveol and citronellol compounds showed rapid bactericidal effect (2 h) at a concentration of 4xMIC, while geraniol presents rapid bactericidal effect (2 h) at a concentration of 2xMIC. None of the evaluated compounds had

bactericidal activity against the *B. cereus* strain. The best antimicrobial activity is related to the presence of phenolic groups, which are already known to exhibit antimicrobial activity, when compared with hydrocarbons, such as limonene, terpinene, camphene, pinene, which presented a weak antimicrobial action.

Key words: Essential oil, terpenes, bacteria, time of death, antimicrobial, bactericidal.

ENCARTE DE PUBLICAÇÃO – Frontier in Microbiology

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE TERPENOS E SESQUITERPENOS

Aline Cristina Guimarães^a, Lohayne Zambon Dir^a, Mayara Fumiere Lemos^a, Marcio Fronza^a, Denise Coutinho Endringer^a, Rodrigo Scherer^{a*}.

^aPharmaceutical Sciences Graduation Program, University of Vila Velha, Espírito Santo, Brazil.

* Corresponding author:

Rodrigo Scherer, Ph.D.

Department of Pharmacy, Universidade Vila Velha / UVV-ES. Comissário José Dantas de Melo St., 21, Boa Vista, Vila Velha, Espírito Santo, Brazil, 29102-770.

Telephone number: 55-27-3421-2198; Fax number: 55-27-3421-2049

Email address: rodrigo.scherer@uvv.br

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar as atividades antibacteriana, bactericida e o estudo do tempo de morte de bactérias de 33 terpenos frequentemente reportados no metabolismo secundário de plantas aromáticas. Inicialmente, foi realizada uma triagem nas concentrações 25 e 1,6 mM pelo método de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella typhimurium*. Após, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo mesmo método apenas com os compostos capazes de inibir o crescimento bacteriano nas concentrações testadas. A determinação da concentração bactericida mínima e o estudo de tempo de morte (0, 2, 4, 8, 12 e 24 h) foram realizados em Agar Mueller Hinton com terpenos nas concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM, onde a redução de $\geq 3 \log_{10}$ UFC da contagem inicial foi definida como efeito bactericida. Dos 33 compostos, apenas sete não apresentaram resultado positivo contra nenhuma das cepas bacterianas testadas, e 16 compostos apresentaram atividade na menor concentração testada. Apenas os compostos carvacrol, eugenol e timol apresentaram atividade positiva contra todas as linhagens em todas as concentrações. O composto timol se apresentou como um potente composto bacteriostático. O eugenol apresentou ação bactericida em apenas duas horas em todas concentrações avaliadas contra *S. typhimurium*. O terpineol apresentou uma redução de 6 \log_{10} UFC na concentração de 2xCIM e de 4xCIM no tempo de 12 horas e 8 horas, respectivamente, para as cepas de *S. aureus*. Na avaliação do tempo de morte das cepas de *E. coli*, os compostos carveol e citronelol apresentaram rápido efeito bactericida (2 h) na concentração de 4xCIM, enquanto que o gerâniool rápido efeito bactericida (2 h) na concentração de 2xCIM. Nenhum dos compostos avaliados apresentou atividade bactericida contra a cepa de *B. cereus*. Melhor atividade antimicrobiana está relacionada à presença dos grupos fenólicos, que já são conhecidos por exibirem atividade antimicrobiana, quando

comparados com hidrocarbonetos, como o limoneno, terpineno, canfeno, pineno, os quais apresentaram faca ação antimicrobiana.

Palavras-chave: Óleo essencial, terpenos, bactérias, tempo de morte, atividade antimicrobiana, bactericida.

1. INTRODUÇÃO

Alimentos contaminados com bactérias patogênicas não só afetam a qualidade do alimento como também representam sério risco à saúde pública. O surgimento das intoxicações alimentares está intimamente ligado às condições higiênico-sanitárias e principalmente a falta de conhecimento das boas práticas de manipulação alimentar. Fatores como a qualidade da matéria-prima, características dos equipamentos e utensílios e todo ambiente utilizado na preparação de alimentos exercem papel fundamental na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos.

Biotipos de *Escherichia coli*, [gram-negativa](#), [anaeróbia](#) facultativa e não produtora de esporos causa infecção do trato urinário, infecção gastrointestinal, colite hemorrágica e até septicemia. Essa bactéria tem sido uma preocupação para a indústria, uma vez que está relacionada a surtos infecciosos devido aos fatores de virulência, que se diferem de acordo com os patótipos (Lee et al., 2012; Guo et al., 2016). A *Salmonella typhimurium*, também anaeróbia facultativa, gram-negativa, possui uma endotoxina, fração do LPS (lipopolissacarídeo) como fator de virulência. É uma das principais bactérias envolvidas em doenças transmitidas por alimentos, sendo considerada uma ameaça à saúde pública em todo o mundo, além de ser a principal causadora de gastroenterite aguda (GEA) de origem alimentar bacteriana (Farret et al., 2015). A bactéria *Staphylococcus aureus*, gram-positiva, é encontrada na pele e mucosas, e é produtora das toxinas da síndrome de choque tóxico, toxina esfoliativa, e enterotoxina. Essa bactéria está geralmente associada a casos de intoxicação alimentar, no qual o processamento de alimentos geralmente é a fonte de contaminação, entre outras patologias (Castro et al., 2015). *Bacillus cereus*, é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, formadora de endosporos (Forghani et al., 2015). Essa bactéria é cada vez mais reconhecida como um agente causador de surtos de intoxicação alimentar, produtora das

toxinas enterotoxina não hemolítica, hemolisina, citotoxina K, e enterotoxinas FM. Essas toxinas são responsáveis por causar toxinfecção no trato gastrointestinal e podem causar a síndrome emética, que é resultante de toxinas presente nos alimentos ingeridos, e as diarreicas, que resulta da ingestão de alimentos contaminados pela bactéria (Li et al., 2016).

Em alimentos, o controle de bactérias patogênicas é normalmente realizado através do uso de aditivos antimicrobianos sintéticos, como por exemplo, os benzoatos, sulfitos, parabenos, nitratos e nitritos, além de outros. Entretanto, estudos mostram que esses aditivos podem causar câncer em diversos tipos de tecidos, como no caso dos parabenos, que podem causar câncer de mama (Darbree Harvey, 2014; Wróble Gregoraszczyk, 2014) e dos nitritos, que através de reações químicas com aminoácidos e proteínas formam as N-nitrosaminas, como a nitrosodimetilamina (NDMA), que é um potente carcinogênico capaz de induzir inúmeros tumores em células animais, como de pulmão, intestino, fígado e estômago (Song et al., 2015). Infelizmente, há muito tempo nos perguntamos, porque a indústria de alimentos ainda utiliza essas substâncias? Nesse sentido, muitos trabalhos têm sido realizados com substâncias naturais na tentativa de encontrar substitutos viáveis para esses aditivos.

Os terpenos constituem um dos grupos mais complexos dos metabólitos secundários encontrados em vegetais. São formados por unidades isoprênicas (C₅), as quais são responsáveis por sua classificação, de forma que duas unidades de isopreno formam os monoterpenos (C₁₀), três unidades formam os sesquiterpenos (C₁₅), quatro unidades formam os diterpenos (C₂₀), seis unidades formam os triterpenos (C₃₀) e os carotenóides são formados por oito unidades (C₄₀) (IUPAC, 2013). Os terpenos podem apresentar diversas funções químicas, como: álcool (linalol, geraniol, carveol, citronelol, terpinol, mentol, borneol, bisabolol), aldeído (citrinal, citronelal), fenol (timol, carvacrol), cetona (carvona, canfora), éter (eucaliptol) e hidrocarbonetos (cimeno, pineno, limoneno, felandreno). Os terpenos são encontrados na composição de óleos essenciais, que são misturas complexas de dezenas de

compostos, que em muitas vezes torna-se difícil de detectar a sua atividade biológica. Na grande maioria dos óleos, três ou quatro compostos, chamados de majoritários, totalizam em cerca 80 a 90 % da composição total do óleo. Além dos terpenos, os óleos essenciais são formados por compostos aromáticos, estes são derivados do fenilpropano, como por exemplo, o composto eugenol (Bakkaliet al., 2008).

A literatura atual apresenta centenas de estudos que relatam atividade antimicrobiana de óleos essenciais, entretanto, a grande maioria dos estudos atribui a atividade aos compostos majoritários sem analisa-los isoladamente. A literatura atual apresenta alguns trabalhos reportando a atividade antimicrobiana de substâncias isoladas, como α -pineno, p-cimeno, γ -terpineno, linalol, α -terpineol (Cosentino et al., 1999), canfora (Magiatis et al., 2002), timol, carvacrol (Guarda et al., 2011; Requena et al., 2015), geraniol (Tomadoni et al., 2015), citronelol, citronelal, carveol e carvona (Romero et al., 2015) no entanto, o número de trabalhos ainda é muito pequeno e as informações limitadas. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar a atividade antibacteriana, bactericida e o tempo de morte de bactérias por terpenos frequentemente reportados no metabolismo secundário de plantas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os padrões de terpenos foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). As espécies bacterianas *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Bacillus cereus* (ATCC 14579) foram obtidas da lista de cepas de referência do INCQS-FIOCRUZ. O reagente DMSO (Dimetilsulfóxido) é proveniente da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), e o ágar e o caldo Mueller-Hinton foi obtido da Himedia Laboratories PVT (Mumbai, Índia). O padrão cloreto de trifêniltetrazolium (CTT) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.2 Screening

Todas as substâncias foram preparadas em DMSO na concentração de 0,5M, a partir da qual foram preparadas as concentrações 25 mM e 1,6mM em caldo Mueller Hinton. O screening dos compostos foi realizado através do método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços. Nas placas foram adicionados 150µL do caldo Mueller Hinton com inóculo (5×10^5 UFC/mL) e 150µL do mesmo meio com terpenos nas das concentrações de 25 mM e 1,6mM. Em todas as placas foram inseridos controle positivo e controle negativo, e todas as análises foram realizadas em triplicata. Ao final do preparo as placas foram incubadas a temperatura de 35°C por 24 h, após esse período foi adicionado 50µL do indicador cloreto de trifeniltetrazolium (CTT) a 0,5% em solução aquosa. Após seis horas de incubação a CIM foi determinado como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível das células conferido pelo CTT (cora células vivas). A partir destes resultados foram selecionados para determinação da concentração inibitória mínima, apenas os compostos que apresentaram atividade em pelo menos uma das concentrações testadas.

2.3 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, segundo as normas Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 1999). A concentração final de células bacterianas foi ajustada na ordem de 5×10^5 UFC/mL na escala 0,5 McFarland utilizando caldo Mueller Hinton para ajuste final. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços pela adição de 150 µL do inóculo e 150 µL da amostra nas concentrações finais de 1600 a 12,5µM. Em todas as placas foram inseridos controle positivo (caldo Mueller Hinton com DMSO e inoculo) e controle negativo (Caldo Mueller Hinton com DMSO), e todas as análises foram realizadas em triplicata. As placas foram incubadas a 36 °C por 24h, e posteriormente foi adicionado 50 µL do indicador cloreto de trifeniltetrazolium (CTT) (0,5% em solução aquosa). Após seis horas de incubação, a CIM

foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível de células conferido pelo CTT (células mortas não são coradas).

2.4 Concentração bactericida mínima

Após a determinação dos valores de CIM foram repicados 10 µL dos poços referentes ao valor da CIM, duas vezes CIM e quatro vezes o valor de CIM em placas de petri com meio Ágar Mueller Hinton, e foram incubadas em estufa a 35°C por 24h. Foi considerada concentração bactericida aquela que não apresentou crescimento após incubação.

2.5 Determinação do tempo de morte das bactérias

A determinação do tempo de morte *in vitro* foi realizada de acordo com a metodologia descrita no documento M26-A do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 1999). As concentrações avaliadas foram a CIM, duas vezes CIM e quatro vezes CIM. O ensaio foi realizado em tubos de 2mL, onde foram adicionados o inoculo (5×10^5 UFC/mL) e os padrões para obter as concentrações finais de CIM, duas vezes CIM e quatro vezes CIM de cada substância, e foram incubados à 35°C. Uma alíquota de 10 µL desse homogeneizado foi adicionada em 990 µL de salina estéril 0,85% e então 100 µL foi adicionado em Ágar Muller Hinton. O plaqueamento ocorreu nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12 e 24 h após o preparo. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C. Após a incubação, as colônias foram contadas manualmente e o resultado obtido foi multiplicado por 1000, obtendo-se assim, a concentração de UFC/mL. Estes valores foram transformados em escala logarítmica para a confecção dos gráficos de tempo de morte. A redução $\geq 3 \log_{10}$ de UFC em comparação com a contagem inicial foi definida como efeito bactericida (CLSI, 1999).

3. RESULTADOS

3.1 Screening

Para avaliar a atividade antimicrobiana, inicialmente foi realizado um teste de triagem dos compostos isolados em duas concentrações 2500 e 1600 μM para excluir do estudo os compostos sem atividade. Dos trinta e três compostos, apenas sete não apresentaram resultado positivo contra nenhuma das cepas bacterianas testadas, e 16 compostos apresentaram atividade na menor concentração testada (Tabela 1). Apenas os compostos carvacrol, eugenol e timol apresentaram atividade positiva contra todas as linhagens em todas as concentrações.

3.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) estão apresentados na Tabela 2. A classificação da ação antimicrobiana de compostos puros não está muito bem consolidada na literatura e apresenta dificuldades de padronização e comparação com resultados prévios, pois muitas variáveis podem afetar o resultado final. Cos et al. (2006), apontam que um composto puro apresenta atividade antimicrobiana relevante e seletiva quando o valor de IC_{50} é inferior a 25 μM , entretanto, não há definição para CIM, por outro lado, os protocolos da CLSI não calculam IC_{50} . Os resultados do presente trabalho mostram que entre os dezesseis compostos com atividade antibacteriana, o timol, carvacrol e eugenol foram os que apresentaram forte ação antimicrobiana contra as quatro espécies avaliadas. Por outro lado, os compostos cimeno, linalol, canfora e limoneno demonstraram a menor ação contra estas espécies avaliadas. O timol e o eugenol foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* na concentração de 25 μM , sendo considerados potentes antimicrobianos pela literatura (Cos et al., 2006).

3.3 Concentração bactericida mínima (CBM)

De modo geral, dos 16 compostos que apresentaram atividade antimicrobiana, apenas seis foram bactericidas (Tabela 3). Nenhum dos compostos avaliados apresentou atividade bactericida (ausência de crescimento) contra a cepa de *B. cereus*. Para *S. aureus*, apenas o timol e o terpineol apresentaram atividade bactericida na concentração de 800 μM . O

timol foi o composto que apresentou os menores valores de CIM contra as cepas avaliadas, no entanto não apresentou atividade bactericida nas concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM, dessa forma, na tentativa de verificar a atividade bactericida do timol, foram avaliadas concentrações maiores e o resultado obtido foi de 800 µM, como apresentado na Tabela 3.

3.4 Determinação do tempo de morte das bactérias

As curvas de cinética de morte permitem a determinação da velocidade da atividade bactericida dos compostos avaliados nesse estudo. No presente estudo foram avaliados apenas os compostos que apresentaram atividade bactericida mínima. A Figura 1 mostra os resultados das curvas de tempo de morte de cinco compostos frente às cepas bacterianas *S. typhimurium*, *S. aureus* e *E. coli*. Os resultados mostraram que a cinética de tempo de morte dos compostos para as três espécies bacterianas, foram dependentes das concentrações, onde concentrações mais elevadas levaram a morte bacteriana mais rápida, revelando efeito dose-dependente.

Os compostos terpineol e eugenol apresentaram ação bactericida contra *S. typhimurium*, onde o eugenol, em apenas duas horas, em todas as concentrações avaliadas, causou a morte das bactérias. Enquanto o terpineol, na concentração de MIC, apresentou redução de 2 log₁₀ UFC, até o tempo de 24 horas, não sendo considerado bactericida nessa concentração. Porém, nas concentrações de 2xCIM e 4xCIM houve redução de 6 log₁₀ UFC em apenas 2 h. O microrganismo *S. aureus* sofreu pouca influência do terpineol na concentração de CIM, pois o número de células foi próximo da contagem do controle. Por outro lado, nas concentrações de 2xCIM e de 4xCIM, houve a redução de 6 log₁₀ UFC no tempo de 12 h e 8 h, respectivamente.

Na avaliação do tempo de morte das cepas de *E. coli*, os compostos carveol, citrionelol e geraniol não foram eficazes na concentração CIM. Por outro lado, os três

compostos apresentaram rápido efeito bactericida na concentração de 4CIM, em duas horas apenas reduzindo 6 log₁₀ UFCa taxa de crescimento bacteriano.

4. DISCUSSÃO

A grande maioria dos estudos que avalia a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais deixa uma lacuna na literatura, uma vez que reportam dificuldade em atribuir a atividade ao composto majoritário ou ao sinergismo entre os compostos, e os poucos trabalhos que avaliam compostos isolados, utilizam um número reduzido de compostos e poucas linhagens bacterianas. Com isso, o presente trabalho traz dados relevantes que contribuirá com estudos posteriores na compreensão da atividade antimicrobiana de óleos essenciais, bem como para aplicação nas indústrias, como na área de alimentos para prevenção do crescimento de bactérias preocupantes em segurança alimentar.

Os resultados do presente estudo estão em acordo com estudos prévios que atribuem uma melhor atividade antimicrobiana à presença dos grupos fenólicos, que já são conhecidos por exibirem atividade antimicrobiana, quando comparados com hidrocarbonetos, como o limoneno, terpineno, canfeno, pineno, os quais apresentaram ação antimicrobiana no presente trabalho (Scherer et al., 2009; Guarda et al., 2011; Wattanasatcha et al., 2012; Requeña et al., 2015). Alguns autores propuseram que núcleos aromáticos, com um grupo funcional polar sejam os responsáveis pela atividade antimicrobiana, mas não se sabe ao certo os meios pelos quais os microrganismos são inibidos pelos óleos essenciais. São sugeridos diferentes modos de ação, sendo as inibições mais frequentes aquelas que envolvem componentes fenólicos de óleos essenciais, os quais atuam na bicamada lipídica da membrana celular e modificam a atividade dos canais de cálcio, causando aumento da permeabilidade e liberação dos constituintes intracelulares vitais. Além disso, os grupos hidroxilas fenólicos, como no timol, eugenol e carvacrol, são bastante reativos e formam ligações de hidrogênio com sítios ativos de enzimas-alvo, inativando-as

(Ismaiele Pierson, 1990; Kimet al., 1995; Ouattara et al., 1997). Como exemplo, o timol que apresentou forte atividade no presente trabalho, é um composto comumente encontrado em muitos óleos essenciais, sendo capaz de inibir as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (Wattanasatcha et al., 2012; Bhatti et al., 2014).

Os compostos avaliados apresentaram melhor atividade bactericida em bactérias gram-negativas, em comparação com as bactérias gram-positivas, pois, somente terpineol e timol apresentaram atividade bactericida contra *S. aureus*, além de o terpineol apresentar cinética mais lenta para *S. aureus* quando comparado com a *S. thymum*. Estudos prévios também relatam esse comportamento verificando maior resistência das bactérias gram-positivas, e citam que a maior resistência das gram-positivas pode ser devido a parede celular que possui uma espessa camada de peptidoglicano, dificultando a passagem de agentes antimicrobianos, conferindo assim rigidez a célula (Magiatis et al., 2002; Rometo et al., 2015). A membrana externa de bactérias gram-negativas possuem os canais porinas, onde ocorre o transporte de substâncias hidrofílicas e de baixo peso molecular, e drogas com características lipofílicas têm dificuldade em atravessar a membrana (Nikaido, 2001). No presente trabalho, os compostos que apresentaram melhor atividade, tanto na determinação da CIM e na cinética de tempo de morte, possuem baixo peso molecular e grupos funcionais polares, tais características podem aumentar a capacidade antimicrobiana pelo fato de facilitar a penetração através da membrana externa celular, ao contrário dos compostos de baixa polaridade como os hidrocarbonetos. Essa hipótese é verificada no resultado do eugenol, fenólico de baixo peso molecular, que apresentou rápida cinética de tempo de morte, levando a morte da *S. thymum* em apenas duas horas, em todas as concentrações testadas, além disso, o presente estudo corrobora com estudo prévio, que descreve que o modo de ação do eugenol contra *S. thymum* envolve a perda da integridade da membrana celular gerando uma superfície danificada, apoiando a ação bactericida do eugenol (Devi et al., 2010).

4. CONCLUSÃO

Os compostos avaliados apresentaram melhor atividade antimicrobiana em bactérias gram-negativas, em comparação com as bactérias gram-positivas, além disso, a grande maioria dos compostos apresentou apenas atividade bacteriostática, como o carvacrol, pois dos 33 compostos, 16 apresentaram CIM igual ou menor que 1,6 mM, e apenas seis foram considerados bactericidas. Oosterpenos oxigenados de baixo peso molecular como, timol, carvacrol, eugenol, citral e geraniol apresentaram forte atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas, principalmente nas Gram negativas. Nenhum dos compostos avaliados apresentou atividade bactericida contra a cepa de *B. Cereus*. Os estudos de tempo de morte confirmaram que o composto eugenol causou a morte da bactéria *S. thiphymurium* apenas duas horas, em todas as concentrações avaliadas. O terpineol apresentou rápida ação bactericida contra *S. thiphymurium* (2 h) e *S. aureus* (8 h). Na avaliação do tempo de morte das cepas de *E. coli*, os compostos carveol e citronelol apresentaram rápido efeito bactericida (2 h) na concentração de 4 CIM, enquanto que o geraniol rápido efeito bactericida (2 h) na concentração de 2CIM.

5. REFERÊNCIAS

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food. Chem. Toxicol.* 46, 446–475.

Bhatti, H.N., Khan, S.S., Khan, A., Rani, M., Ahmad, V.U., Choudhary, M.I. (2014). Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities. *Phymed.* 21, 1597–1626.

Castro, A., Santos, C., Meireles, H., Silva, J., Teixeira, P.(2015).Food handlers as potential sources of dissemination of virulent strains of *Staphylococcus aureus* in the community.*J. Infect. Public.Health.* 8, 153-160.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (1999).Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline M26A; Approved standard, M26-A.Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *J. Ethnopharmacol.* 106, 290–302.

Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M.,Mascia, V., Arzedi, E.,Palmas, F.(1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils.*Lett. Appl. Microbiol.*29, 130–135.

Darbre, P.D., Harvey, P.W. (2014). Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: A review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status *J.Appl.Toxicol.* 34 (9), 925-938.

[Devi](#), K.P., [Nisha](#), S.A., Sakthivel, R.,[Pandian](#), K.(2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. [J.Ethnopharmacol.](#)130, 107–115.

Farre, M. R. S., Sanchez, D. O., Varela, C. A., Sanahuja, M. S., Recasens, A. R., Jove, J. P. (2015). Aspectos epidemiologicos y carga asistencial de gastroenteritis agudas por *Campylobacter* y *Salmonella*. *Med. Clin.* 145,294–297.

Forghani, F., Langaee, T., Eskandari, M., Seo, K., Chung, M., Oh, D.(2015). Rapid detection of viable *Bacillus cereus* emetic and enterotoxic strains in food by coupling propidiummonoazide and multiplex PCR (PMA-mPCR). *Food. Cont.* 55, 151-157.

Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J., Galotto, M. J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *J. Food Microbiol.* 146, 144–150.

Guo, Y., Wang, Y., Liu, S., Yu, J., Wang, H., Wang, Y., Huang, J. (2016). Label-free and highly sensitive electrochemical detection of *E. coli* based on rolling circle amplifications coupled peroxidase-mimicking DNAzyme amplification. *Biosens. Bioelectron.* 75, 315-319.

Ismail, A.; Pierson, M. D. (1990). Inhibition of germination, out growth, and vegetative growth of *Clostridium botulinum* 67B by spice oils. *J. Food Protect.* 53, 755-758.

Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five food-borne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2839-2845.

Lee, D.W, Gwack, J., Youn, S.K. (2012). Enteropathogenic *Escherichia coli* Outbreak and its Incubation Period: Is it Short or Long?. *Health. Res. Perspect.* 3, 43-47.

Li, F., Zuo, S., Yu, P., Zhou, B., Wang, L., Liu, C., Wei, H., Xu, H. (2016). Distribution and expression of the enterotoxin genes of *Bacillus cereus* in food products from Jiangxi Province, China. *Food Control.* 67, 155-162.

Liolios, C.C.A., Gortzi, O. B., S. Lalas, B., Tsaknis, J. C. Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chem.* 112, 77–83.

Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., Chinou, I., Haroutounian, S.A. (2002). Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species. *Z. Naturforsch C.* 57, 287-290.

Nikaido, H. (2001). Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Mol. Cell. Biol.* 21, 215–223.

Nomenclature of Organic Chemistry: IUPAC Recommendations and Preferred Names 2013. Royal Society of Chemistry, 2013.

Ouattara, B.; Simard, R. E.; Holley, R. A.; Piette, G. J. P.; Bégin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International J. Food. Microbiol.* 37, 155-162.

Requena, V. H. C., Requena, B. L. R., Perez M. A., Figueroa C. R., Sanfuentes, E.A. (2015). The synergistic antimicrobial effect of carvacrol and thymol in clay/polymer nanocomposite films over strawberry gray mold. *Food Sci. Technol*, 64, 390-396.

Romero, J. C. L., Rios, G. H., Borges, A., Simões, M. (2015). Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evid. Based. Complement Alternat Med.* 9.

Scherer, R., Wagner, R., Duarte, M.C.T., Godoy, H.T. (2009). Composition and antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa essential oils. *Braz. J. Med Plants.* 11, 442-449.

Song, P., Wu, L., Guan, W. (2015). Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Nutrients.* 7, 9872–9895.

Tomadoni, B., Cassani L., Moreira, M. R., Ponce, A. (2015). Efficacy of vanillin and geraniol in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on strawberry juice. *Food Sci. Technol*, 64, 554-557.

Wattanasatchaa, A., Rengpipatb, S., Wanichwecharungruangc, S. (2012). Thymolnanospheres as an effective anti-bacterial agent. *J. Pharm.* 434, 360–365.

Wróbel, A.M., Gregoraszcuk, E.T. (2014). Actions of methyl-, propyl- and butylparaben on estrogen receptor- α and - β and the progesterone receptor in MCF-7 cancer cells and non-cancerous MCF-10A cells. *Toxicol. Lett.* 230 (3), 375-381.

Tabela 1: Atividade antibacteriana dos compostos isolados na concentração de 2500 e 1600 μM

Composto	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.aureus</i>
	2500 μM	1600 μM	<i>typhimurim</i>	<i>typhimurium</i>	2500 μM	1600 μM	2500 μM	1600 μM
			2500 μM	1600 μM				
Bisabolol (α)	+	-	-	-	-	-	+	-
Borneol (-)	+	+	+	+	+	+	+	+
Borneol (+)	+	+	+	+	+	+	+	+
Canfeno	-	-	-	-	-	-	+	-
Canfora	+	+	+	+	+	+	+	+
Carvacrol	+	+	+	+	+	+	+	+
Carveol	+	+	+	+	+	+	+	+
Carvona	-	-	+	-	+	-	+	-
Carvona (L)	+	+	+	+	+	+	+	+
Cimeno (m)	+	+	+	+	+	+	+	+
Cimeno (p)	-	-	-	-	+	-	-	-
Citral	+	+	+	+	+	+	+	+
Citronelal	+	+	+	+	+	+	+	+

Composto	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.aureus</i>
	2500 μ M	1600 μ M	<i>typhimurim</i>	<i>typhimurium</i>	2500 μ M	1600 μ M	2500 μ M	1600 μ M
			2500 μ M	1600 μ M				
Citronelol	+	+	+	+	+	+	+	+
Eucaliptol	-	-	+	-	+	-	+	-
Eugenol	+	+	+	+	+	+	+	+
Geraniol	+	+	+	+	+	+	+	+
Guaieno	+	-	-	-	-	-	+	-
Limoneno	+	+	+	+	+	+	+	+
Linalol	+	+	+	+	+	+	+	+
Mirceno	+	-	-	-	+	-	+	-
Ocimeno	-	-	+	-	+	-	-	-
Terpineol	+	+	+	+	+	+	+	+
Terpinoleno	+	-	+	-	+	-	+	-
Tymol	+	+	+	+	+	+	+	+
Valenceno	+	-	-	-	+	-	+	-
Cariofileno(β)	-	-	-	-	-	-	-	-
Felandreno(α)	-	-	-	-	-	-	-	-

Composto	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S.</i>	<i>S.</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.aureus</i>
	2500 μ M	1600 μ M	<i>typhimurim</i>	<i>typhimurium</i>	2500 μ M	1600 μ M	2500 μ M	1600 μ M
Humuleno (α)	-	-	-	-	-	-	-	-
Pineno (α)	-	-	-	-	-	-	-	-
Pineno (β)	-	-	-	-	-	-	-	-
Sabineno	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpineno(Y)	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) houve crescimento bacteriano; (+) não houve crescimento bacteriano.

Tabela 2 -Concentração inibitória mínima (μM) dos compostos.

Compostos	<i>B. cereus</i> (ATCC14579)	<i>S. typhimurium</i> (ATCC 14028)	<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)
Borneol (-)	800	800	1600	200
Borneol (+)	1600	800	1600	1600
Canfora	1600	1600	1600	100
Carvacrol	200	100	200	100
Carveol	800	200	400	100
Carvona (L)	1600	800	400	100
Cimeno (m)	1600	1600	1600	1600
Citral	200	400	400	400
Citronelal	800	800	1600	1600
Citronelol	800	800	1600	200
Eugenol	400	400	200	25
Geraniol	400	200	400	100
Limoneno	1600	400	1600	1600
Linalol	1600	1600	1600	1600
Terpineol	800	800	400	200
Timol	50	25	50	50

Tabela 3- Valores da concentração bactericida mínima (μM) dos compostos puros.

Composto	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Carveol	-	-	1600	-
Citronelol	-	-	1600	-
Eugenol	-	400	-	-
Geraniol	-	-	1600	-
Terpineol	-	1600	-	800
Timol	-	800	800	800

(-) houve crescimento bacteriano.

Figura 1: Avaliação do tempo de morte das bactérias *S. thiphymurium*, *S. aureus* e *E. coli*.

