

Atividade antibacteriana do R-(+)- Limoneno: uma revisão sistemática

Millena de Souza Alves^{1a}, Maria Alice Araújo de Medeiros^{1b},
Abraão Alves de Oliveira Filho^{2c}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal, Centro de Saúde e tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Brasil.

² Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Brasil.

Correios eletrônicos:

^a millenaasouzaa@gmail.com

^b medeirosallice22@gmail.com

^c abrahao.alves@professor.ufcg.edu.br

Recebido: 21 de janeiro de 2022

Revisado: 23 de março de 2022

Aceto: 30 de março de 2022

RESUMO

Introdução: as bactérias são organismos unicelulares e procariontes que podem ser causadores de doenças e uma das principais causas de morte em muitos países. O constante desenvolvimento e aumento das bactérias resistentes retratam uma ameaça para a saúde pública, o que conduz a uma necessidade urgente de novos compostos com ação antimicrobiana, onde se destaca os produtos naturais com grande potencial para possíveis agentes antibacterianos, como os terpenos. **Objetivo:** realizar uma revisão sistemática para avaliar o potencial terapêutico do R-(+)-Limoneno contra bactérias patogênicas. **Metodologia:** a pesquisa teve como foco documentos escritos em inglês e português publicados entre 2011 e 2021. Os dados foram coletados na literatura disponível nos Periódicos eletrônicos da CAPES, empregando três bases de dados: Embase, Pubmed e Web of Science. A organização dos estudos e sua gestão até o final da redação foi realizada com o auxílio do software Mendeley. **Resultados:** foram identificados, inicialmente 1367 artigos, após refinamento da busca, culminou em 15 artigos eleitos para construção da revisão, no qual o R-(+)-Limoneno tanto em sua forma isolada, como associado a outro composto apresentou efeito antibacteriano contra cepas de bactérias, tanto gram positivas, como gram negativas. **Conclusão:** o terpeno R-(+)-Limoneno pode ser considerado como uma substância promissora para o combate de doenças causadas por bactérias patogênicas. No entanto, mais estudos são necessários para aprofundar o mecanismo de

ação, bem como, frente a mais espécies bacterianas isoladas de diferentes origens, a fim de se compreender de forma mais eficaz esse efeito biológico encontrado.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, terpeno, produto natural.

SUMMARY

Antibacterial activity of R-(+)-Limonene: a systematic review

Introduction: Bacteria are unicellular and prokaryotic organisms that can be a cause of disease and one of the main causes of death in many countries. The constant development and increase of resistant bacteria poses a threat to public health, which leads to an urgent need for new compounds with antimicrobial action, in which natural products with great potential for possible antibacterial agents, such as terpenes, stand out. **Aim:** To carry out a systematic review to evaluate the therapeutic potential of R-(+)-Limonene against pathogenic bacteria. **Methodology:** The research focused on documents written in English and Portuguese published between 2011 and 2021. Data were collected from the literature available in CAPES electronic journals, using three databases: Embase, Pubmed and Web of Science. The organization of studies and their management until the end of writing was carried out with the help of Mendeley software. **Results:** Initially 1367 articles were identified, after refinement of the search, culminating in 15 articles elected for the construction of the review, in which R-(+)-Limonene both in its isolated form and associated with another compound showed antibacterial effect against strains bacteria, both gram positive and gram negative. **Conclusion:** the terpene R-(+)-Limonene can be considered as a promising substance to fight diseases caused by pathogenic bacteria. However, more studies are needed to deepen the mechanism of action, as well as, against more bacterial species isolated from different origins, in order to more effectively understand this biological effect found.

Keywords: Antibacterial activity, terpene, natural product.

RESUMEN

Actividad antibacteriana del R-(+)-Limoneno: una revisión sistemática

Introducción: las bacterias son organismos unicelulares y procarióticos que pueden ser causantes de enfermedades y una de las principales causas de muerte en muchos países. El constante desarrollo e incremento de bacterias resistentes supone una amenaza para la salud pública, lo que conduce a una urgente necesidad de nuevos compuestos con acción antimicrobiana, en los que destacan productos naturales con gran potencial de posibles agentes antibacterianos, como los terpenos. **Objetivo:** llevar a cabo una revisión sistemática para evaluar el potencial terapéutico del R-(+)-limoneno frente a bacterias patógenas. **Metodología:** la investigación se centró en documentos escritos en inglés y portugués publicados entre 2011 y 2021. Los datos fueron recolectados de la literatura disponible en las revistas electrónicas de la CAPES, utilizando tres bases de datos: Embase, Pubmed y Web of Science. La organización de los estudios y su gestión hasta el final de la redacción se realizó con la ayuda del software Mendeley. **Resultados:** inicialmente se identificaron 1367 artículos, luego del refinamiento de la búsqueda, culminando en 15 artículos elegidos para la construcción de la revisión, en los cuales el R-(+)-Limonene tanto en su forma aislada como asociado a otro compuesto mostró efecto antibacteriano contra cepas bacterias, tanto gram positivas como gram negativas. **Conclusión:** el terpeno R-(+)-Limonene puede considerarse como una sustancia prometedora para combatir enfermedades causadas por bacterias patógenas. Sin embargo, se necesitan más estudios para profundizar en el mecanismo de acción, así como, contra más especies bacterianas aisladas de diferentes orígenes, para comprender de manera más efectiva este efecto biológico encontrado.

Palabras clave: actividad antibacteriana, terpeno, producto natural.

INTRODUÇÃO

Bactérias são organismos unicelulares e procariontes que podem ser causadores de doenças e uma das principais causas de morte em muitos países [1, 2]. As mesmas podem ser classificadas de acordo com sua patogenicidade em comensais, que habitam a microbiota normal humana, e em patogênicas, responsáveis por provocar infecções bacterianas [3].

Logo, essas infecções classificam-se de acordo com a proporção do dano causado no organismo do hospedeiro, podendo ser um dano local ou generalizado, nessa situação representada pela septicemia ou bacteremia, além de outras doenças, como a pneumonia, coqueluche, infecções do trato urinário e endocardites [4].

Nesse contexto, com a utilização dos antibióticos o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias revolucionou e as taxas de morbidade e mortalidade associadas a essas infecções reduziram [5]. Entretanto, o uso indiscriminado e excessivo de antimicrobianos nas comunidades, em ambientes hospitalares ou até mesmo em uso agropecuário colabora diretamente para o desenvolvimento da resistência bacteriana, elevando os custos com tratamentos, além da hospitalização prolongada dos pacientes aumentando ainda mais os índices de morbimortalidade [6].

Uma abordagem cada vez mais popular para lidar com a resistência antimicrobiana (AMR) é One Health (Saúde Única), que corriqueiramente é apresentada como uma preocupação de saúde acerca do conhecimento das relações humano-animal-ambiente. One Health é utilizado como uma estrutura para colaboração entre organizações internacionais como a Organização Mundial de Saúde, a Organização Mundial da Saúde Animal e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura; além de que, ocupa uma posição de destaque nos documentos de política internacional da AMR [7].

Dessa forma, o constante desenvolvimento e aumento das bactérias resistentes retratam uma ameaça para a saúde pública, o que conduz a uma necessidade urgente de novos compostos com ação antimicrobiana, nesse caso, pode-se destacar os produtos naturais como sendo de grande potencial para possíveis agentes antibacterianos [8, 9], como exemplo os terpenos.

Os terpenos e seus derivados estão associados aos óleos essenciais, os mesmos são considerados compostos voláteis formados por unidades de isopreno (5C), que apontam funções químicas orgânicas, como ácidos, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outros [10].

Dentre os diversos terpenos, é possível destacar o Limoneno, um monoterpene do metabolismo secundário, principalmente, de plantas do gênero *Citrus* [11]. O Limoneno conta com dois enantiômeros, o isômero levógiro S-Limoneno ou (-)-Limoneno ou L-Limoneno, um dos constituintes produzidos por árvores como pinheiros e carvalhos e o isômero dextrógiro R-Limoneno ou (+)-Limoneno ou D-Limoneno, um hidrocarboneto monocíclico naturalmente produzido por plantas e frutas e o principal componente de óleos presentes em cascas de frutas cítricas tais como laranja, limão e bergamota [12, 13]. Além disso, o R-(+)-Limoneno possui propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatórias e anticancerígenas [14].

Diante do conhecimento acerca do R-(+)-Limoneno com possíveis propriedades em atividades antimicrobianas, este estudo tem como objetivo realizar uma revisão sistemática para avaliar o potencial terapêutico do R-(+)-Limoneno contra bactérias patogênicas.

METODOLOGIA

A revisão sistemática baseia-se em sintetizar a produção dos conhecimentos científico numa área específica, englobando parte da literatura de forma não tendenciosa, visando agregar, sintetizar e interpretar estudos sobre um determinado assunto, preservando a integridade das fontes de informação com o intuito de fundamentar teoricamente a temática [15].

Elaboração da pergunta

A caracterização da pergunta baseou-se na estratégia PICO, que significa P: população (bactérias), I: intervenção (efeito do R-(+)-Limoneno), C: comparação (bactérias tratadas com antibacterianos) e O: *outcomes*/resultados (potencial antibacteriano). Qual o potencial terapêutico do R-(+)-Limoneno frente a bactérias patogênicas?

Protocolo e coleta de dados

A revisão foi conduzida conforme as recomendações PRISMA-P (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses Protocols) [16]. A pesquisa foi realizada no período entre novembro e dezembro de 2021 e teve como foco documentos escritos em inglês e português publicados entre 2011 e 2021. Os dados foram coletados na literatura disponível nos periódicos eletrônicos da CAPES, empregando três bases de dados: Embase, PubMed e Web of Science, por meio das seguintes combinações de descritores e operadores booleanos: “antibacterial activity” AND “R-(+)-Limonene” e “antibacterial activity” AND Limonene. A organização dos estudos e sua gestão até o final da redação foi realizada com o auxílio do software Mendeley.

Critério de inclusão e exclusão

Como critério de inclusão adotou-se: artigos originais que estavam de acordo com a temática do estudo envolvendo atividade antibacteriana e o composto R-(+)-Limoneno e com escrita em inglês ou português. Por sua vez, foram excluídos artigos de revisão, monografias, dissertações, teses, artigos duplicados e aqueles que não constituíram o tema do estudo.

Risco de viés

A qualidade dos métodos utilizados e a análise do risco de viés do estudo foram realizadas de acordo com as recomendações PRISMA-P [16]. A avaliação deu prioridade à descrição das informações com clareza, a revisão foi realizada por dois revisores de forma independente e em caso de desacordo foi envolvido um terceiro revisor, evitando qualquer viés potencial e conflito de interesses, mascarando os nomes dos autores e revistas.

Extração dos dados

As informações extraídas dos artigos foram: autor(es), ano, objetivo e os principais resultados obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a busca na literatura foram identificados inicialmente 1367 artigos, destes 280 foram excluídos por estarem duplicados nas bases de dados e outros 143 por serem documentos de revisão, monografias, dissertações ou teses. Desta forma, restaram 944 para leitura de título e resumo, desses 916 artigos foram excluídos por não contemplarem os critérios de inclusão, o que culminou em 28 artigos avaliados para elegibilidade, desses 13 foram excluídos por não realizar experimento com o composto em estudo e por fim 15 artigos foram eleitos para construção da revisão, descrita detalhadamente na figura 1.

Destes artigos observa-se o potencial antibacteriano do R-(+)-Limoneno tanto em sua forma isolada, como associado a outro composto contra diferentes cepas de bactérias, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Xanthomonas oryzae*.

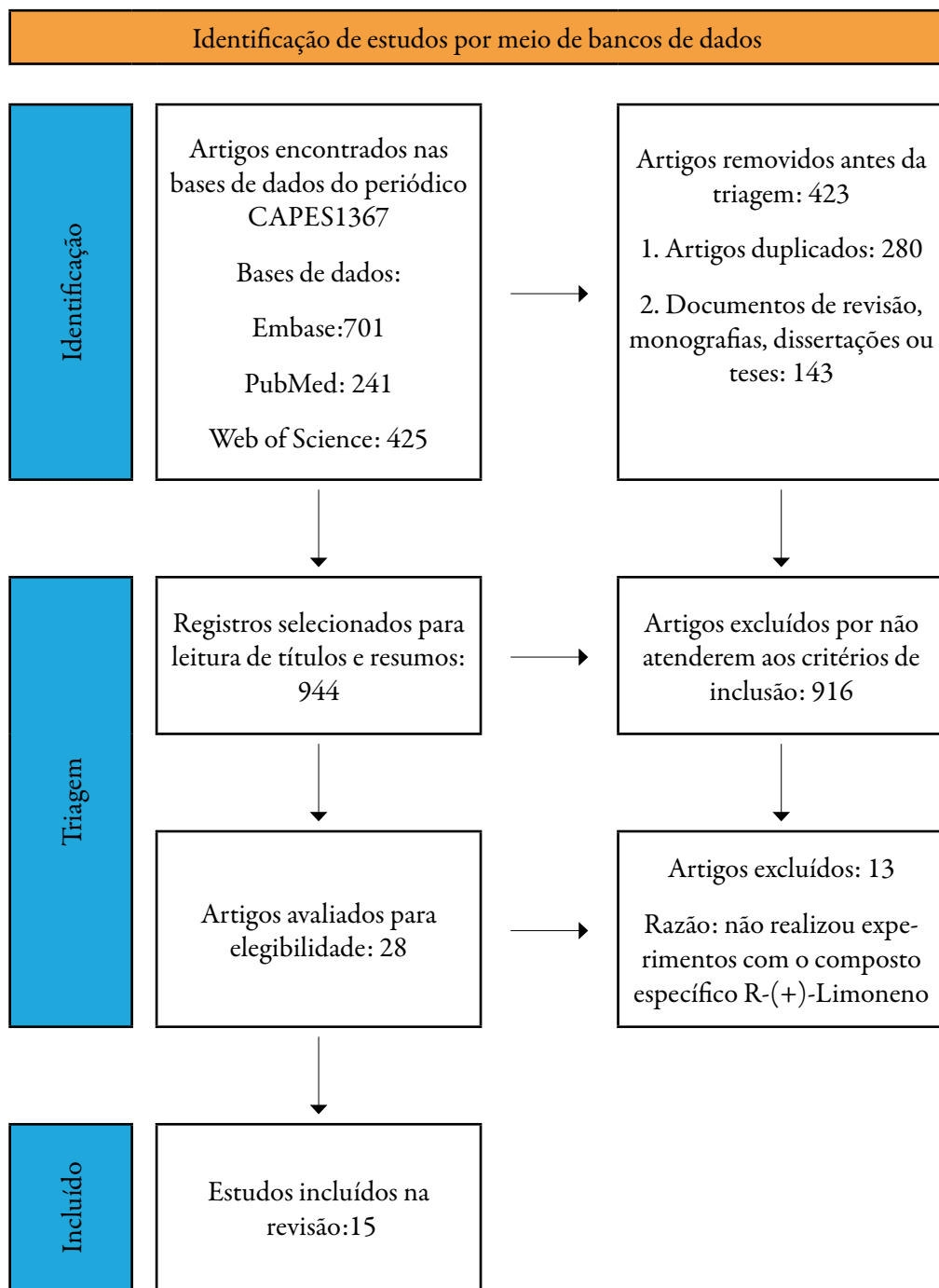


Figura 1. Fluxograma da estratégia de buscas baseado no protocolo PRISMA.

Os resultados principais dos estudos selecionados, como também a caracterização do autor, ano e objetivo estão descritos e sintetizados na tabela 1.

Tabela 1. Caracterização do autor, ano, objetivo e resultados principais incluídos na análise de dados da pesquisa.

Autor/ano /referência	Objetivo	Resultados principais
Costa <i>et al.</i> , 2019 [17]	Avaliar a atividade antibacteriana do D-Limoneno, isolado e complexado com β -ciclodextrina, além de avaliar sua atividade modulatória com diferentes classes antibióticas.	D-Limoneno mostrou uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) igual a 256 $\mu\text{g/mL}$ contra <i>Staphylococcus aureus</i> padrão e 512 $\mu\text{g/mL}$ contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente, bem como um efeito sinérgico quando associado à gentamicina.
Yao <i>et al.</i> , 2017 [18]	Demonstrar que quitosana solúvel em água, gelatina de peixe e D-Limoneno podem ser candidatos precursores para preparar material de embalagem de alimentos comestíveis de baixo custo e alto desempenho.	O filme comestível de quitosana de gelatina de peixe contendo a maior concentração de D-Limoneno, inibiu efetivamente o crescimento de <i>Escherichia coli</i> , produzindo halos de cerca de 22 mm.
Silva <i>et al.</i> , 2021 [19]	Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM), analisar a terapia combinada com florfenicol e oxitetraciclina e verificar a atividade de inibição de biofilme dos fitoquímicos R-(+)-Limoneno e S-(-)-Limoneno contra algumas bactérias isoladas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).	R-(+)-Limoneno apresentou atividade antibacteriana fraca contra <i>Aeromonas hydrophila</i> e nenhuma atividade contra <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Raoultella ornithinolytica</i> e <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . No entanto, inibiu fortemente a formação de biofilme de <i>A. hydrophila</i> . R-(+)-Limoneno teve um efeito aditivo quando combinado com florfenicol e um efeito antagonista com oxitetraciclina.
Shao <i>et al.</i> , 2018 [20]	Desenvolver um revestimento comestível incorporando diferentes concentrações de emulsão de R-(+)-Limoneno em <i>Ulva fasciata</i> e avaliar a eficácia antimicrobiana contra inóculos de diferentes bactérias.	Os revestimentos comestíveis com pelo menos 0,15% w/w de R-(+)-Limoneno melhoraram a estabilidade microbiana dos morangos, demonstrou eficácia na descontaminação de patógenos externos como <i>E. coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>S. aureus</i> .

Autor/ano /referência	Objetivo	Resultados principais
Lan <i>et al.</i> , 2020 [21]	Fornecer uma visão inicial sobre propriedades do filme composto PVA (álcool polivinílico)/CS(quitosana)/DL (D-Limoneno) e a viabilidade alternativa de filmes de embalagem poliméricas naturais para prolongar a vida de produtos frescos e processados.	A adição de D-Limoneno melhorou a atividade antibacteriana dos filmes de PVA e CS contra as duas patologias mais comuns: <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .
Su <i>et al.</i> , 2020 [22]	Investigar o efeito de goma arábica (GA) na estabilidade física de emulsões estabilizadas com β -lactoglobulina (β -lg) e, em seguida, comparar a estabilidade de camada única/bicamada sob tratamento UHT e avaliar a eficiência antibacteriana das emulsões de D-Limoneno com ou sem tratamento UHT.	Foi detectado que o valor MIC da emulsão contendo D-Limoneno estabilizadas por membranas de camada única (β -lg) aumentou após o tratamento com UHT contra as bactérias testadas (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>B. subtilis</i>). Já o tratamento UHT utilizando emulsões estabilizadas por membranas de bicamada (β -lg-GA) não tem impacto nas propriedades antibacterianas.
Zhang <i>et al.</i> , 2014 [23]	Estudar os efeitos da nisina sobre a atividade antimicrobiana do D-Limoneno e sua nanoemulsão e desenvolver um novo sistema de entrega antimicrobiana combinando o efeito positivo desses dois agentes antibacterianos ao mesmo tempo.	O D-Limoneno exibiu efeitos inibitórios elevados em relação ao crescimento em todas as cepas de bactérias testadas (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>B. subtilis</i>). A combinação de D-Limoneno e nisina exibiu um sinergismo em relação a <i>S. aureus</i> e <i>B. subtilis</i> , e exibiu um efeito aditivo para <i>E. coli</i> . Os efeitos das nanoemulsões de D-Limoneno em combinação com nisina contra todos os microrganismos exibiu um desempenho antimicrobiano muito mais forte comparado com a nanoemulsão sem nisina e D-Limoneno não processado.

Autor/ano /referência	Objetivo	Resultados principais
Umagiliyage <i>et al.</i> , 2017 [24]	Investigar a atividade antimicrobiana de nanovesículas unilamelares (lipossoma) contendo D-Limoneno contra bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos (<i>E. coli</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>) e fungos apodrecedores de frutas selecionados (<i>Botrytis cinerea</i> e <i>Penicillium criségeno</i>).	A atividade antibacteriana do lipossoma contendo D-Limoneno foi mais elevada contra bactéria gram positiva <i>L. monocytogenes</i> do que na bactéria gram-negativa <i>E. coli</i> nas concentrações de 10 µM e 50 µM. Dessa forma, lipossomas contendo Limoneno foram considerados úteis para reduzir a perda de armazenamento devido à deterioração.
Roy e Rhim, 2020 [25]	Preparar um filme funcional a base de Pullulan/Carrageenan integrando Sulfeto de cobre (CuSNP) e D-Limoneno (DL) como enchimentos para aplicações de embalagem de alimentos ativos e investigar o efeito de CuSNP e Limoneno isoladamente ou em combinação com filmes à base de Pullulan/Carrageenan.	Filmes contendo a combinação CuSNP e DL apresentou um efeito bactericida superficial. Já o D-Limoneno mostrou apenas alguma atividade antibacteriana contra o patógeno <i>E. coli</i> enquanto que o CuSNP mostrou forte redução contra <i>E.coli</i> e leve redução contra <i>L.monocytogenes</i> .
Lan <i>et al.</i> , 2019 [26]	Investigou a influência da adição de D-Limoneno a nanomateriais de PVA eletrofiado e analisou o processamento ultrassônico de fibras eletrofiadas de PVA/D- limoneno em diferentes composições, como também avaliou a atividade antibacteriana contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .	A adição do composto D-Limoneno elevou a inibição do crescimento dos dois patógenos testados (<i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>), porém o maior efeito antibacteriano foi para <i>E. coli</i> .
Guo <i>et al.</i> , 2020 [27]	Investigar as propriedades estruturais e antimicrobianas das microemulsões à base de polissorbatos (Tween 60 e 80) (PMEs) para encapsulação de R-(+)-Limoneno (LMN).	A diluição L60 apresentou CIM menor para <i>S. aureus</i> em comparação com a CIM de L80 e Limoneno total (LMN) e para as cepas de <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> a CIM de L60 e L80 teve melhor efeito do que a do LMN.

Autor/ano /referência	Objetivo	Resultados principais
Mehanna <i>et al.</i> , 2020 [28]	Desenvolver um nanomulgel ocular eficaz <i>in-situ</i> à base de R-(+)-Limoneno para aumentar a eficácia das fluoroquinolonas contra a infecção do biofilme ocular associada a cepas de <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA).	Verificou-se que a CIM do Sistema de Entrega Autonanoemulsificantes (SNEDS) à base de R-(+)-Limoneno sozinho mostrou alta concentração (25µg/ml), enquanto que a CIM do SNEDS a base de R-(+)-Limoneno carregado com levofloxacina foi menor (3,12µg/ml), o que também ocorreu para os resultados de CBM contra o mesmo patógeno, onde SNEDS à base de Limoneno carregado com levofloxacina apresentou menor valor (12,5 µg/ml). Em relação à formação de biofilme a inibição é observada apenas com SNEDS a base de Limoneno carregado com levofloxacina.
Salehi <i>et al.</i> , 2021 [29]	Realizar encapsulamento de D- Limoneno (L) em nanoesponjas de β-ciclodextrina (CD-NS) para desenvolver um sistema de liberação controlada para que L obtenha uma atividade antibacteriana adequada para aplicações em alimentos.	A CIM e CBM com melhor resultado encontrado foi do encapsulamento de Limoneno em nanoesponjas (L-NS) para todas as bactérias testadas e o patógeno mais susceptível foi a <i>Shigella flexneri</i> , o que indica que pode inibir completamente o crescimento bacteriano.
Sieniawska <i>et al.</i> , 2018 [30]	Investigar se os terpenos naturais apresentam alguma ação sinérgica com agentes antituberculose contra cepas clínicas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> multirresistentes (MTb).	R-(+)-Limoneno apresentou boa atividade antibacteriana contra todas as cepas testadas (MIC = 128–256 µg/mL) e para a cepa H37Ra apresentou uma inibição de (32µg/mL). O mesmo também influenciou positivamente a maioria das cepas testadas quando combinado com os antibióticos (etambutol, rifampicina e isoniazida).
Lee <i>et al.</i> , 2016 [31]	Verificar as principais funções biológicas dos terpenos voláteis (α-pineno, limoneno (R e S) e α-copaeno) indutores de mancha bacteriana do arroz, causada por <i>Xanthomonas oryzae</i> (Xoo)	R-(+)-Limoneno só inibiu significativamente o crescimento do Xoo em concentrações mais elevadas, já em ensaios de difusão em disco o R-(+)-Limoneno apresentou pouco ou nenhum efeito na inibição de Xoo.

O composto R-(+)-Limoneno constituinte em diferentes óleos essenciais ou isoladamente apresenta um potencial antibacteriano contra bactérias do grupo dos cocos e bacilos, tanto Gram positivo do gênero *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, quanto Gram negativo do gênero *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Shigella*, *Xanthomonas*. Além disso, também foi identificado efeito antibacteriano contra o gênero *Mycobacterium*.

Segundo Costa *et al.* [17] em seu estudo avaliaram o D-Limoneno através do método de microdiluição em caldo e verificou a concentração inibitória mínima (CIM) e o efeito modulador comparativo do Limoneno sozinho e em associação com antibióticos. Dessa forma, o D-Limoneno apresentou relevante atividade antibacteriana clínica, para bactérias Gram-positivas (SA ATCC 25923) e Gram-negativas (PA 24), bem como um efeito sinérgico quando associado à gentamicina contra *S. aureus* e *E. coli*, para os demais medicamentos testados apresentou efeito antagônico.

Nesse contexto, em uma pesquisa onde foi avaliado o potencial antibacteriano das diluições de D-Limoneno (L60 e L80) foi constatado que as mesmas exibiram uma boa atividade antimicrobiana contra todas as três cepas testadas (*S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*). A combinação de LMN e ϵ -polilissina (EPL) apresentou efeito sinérgico contra todas as bactérias testadas. Dessa forma, observou que o trabalho fornece informações úteis sobre a aplicação dos polissorbatos como carreadores para encapsulamento de óleos essenciais em indústrias farmacêuticas [27].

De forma semelhante, identificou-se que a adição de D-Limoneno a nanomateriais de PVA eletrofiado aumentou a inibição do crescimento de ambos os tipos de bactérias (*E. coli* e *S. aureus*), onde o efeito antibacteriano foi melhor para *E. coli*. O processamento ultrassônico melhorou as propriedades antibacterianas, pois possibilita o aumento do teor de D-Limoneno por unidade de área da fibra, aumentando seu contato com as bactérias e consequentemente aumentando as propriedades antibacterianas [26].

De acordo com Silva *et al.* [19], os fitoquímicos (R-(+)-Limoneno e S-(-)-Limoneno) demonstraram atividade antibiofilme forte contra *Aeromonas hydrophila* e quando combinado com florfenicol, mostraram um efeito aditivo no tratamento da mesma bactéria. O mesmo informa que os fitoquímicos testados podem ser agentes de terapia de combinação promissores com florfenicol para aplicações potenciais em infecções clínicas, porém é necessária a investigação da atividade antibacteriana destes compostos contra bacteriose in vivo, pois in vitro não permite uma boa previsão do efeito in vivo.

Um estudo realizado com a emulsão do D-Limoneno frente várias técnicas, dentre elas, a Concentração Inibitória Mínima (CIM), observou-se que os valores da CIM da emulsão estabilizada com β -lg (camada única) aumentou significativamente após o tratamento com UHT frente as três cepas de bactérias testadas (*E. coli*, *S. aureus* e *B.*

subtilis). Enquanto que, nenhuma diferença da CIM pode ser encontrada entre emulsões de bicamada com ou sem processamento UHT, confirmando o comportamento melhorado das emulsões de bicamada no processamento UHT. Dessa forma, os resultados do trabalho fornecem possibilidade de incorporar óleos essenciais com atividade antimicrobiana em um sistema de entrega de emulsão com uma alta estabilidade físico-química e processabilidade UHT [22].

De forma corroborativa Mehanna, Mneimneh e Abed El Jalil [28] além de outras técnicas, verificou a atividade antimicrobiana, onde pôde analisar a CIM, CBM e a formação de biofilme contra *S. aureus* resistente a meticilina com base no Sistema de Entrega Autonanoemulsificantes (SNEDS) à base de R-(+)-Limoneno carregado ou descarregado com levofloxacina. Desse modo, verificou que tanto para CIM, como para CBM e para formação de biofilme o SNEDS a base de R-(+)-Limoneno carregado com levofloxacina teve melhor efeito e pôde-se observar que esse sistema carregado com levofloxacina é uma alternativa promissora contra bactérias resistentes e formadoras de biofilme.

Nessa conjuntura, em uma pesquisa realizada com o R-(+)-Limoneno frente cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistente (MTb), o mesmo apresentou boa atividade antibacteriana, como também em associação com antibiótico demonstrou efeito positivo. Portanto, sendo considerado promissor para o tratamento contra (MTb) [30].

No contexto dos estudos, Lee *et al.* [31] demonstraram que a estereoespecificidade do composto pode ser um fator determinante de funções biológicas, pois apenas o enantiômero específico, (S)-Limoneno e não (R)-Limoneno, apresentou atividade antibacteriana forte contra Xoo. Os resultados demonstram a possibilidade de que apenas o enantiômero (S)-Limoneno pode ser usado como uma alternativa de produto químico ecológico para controlar a doença na fase de muda.

No entanto, pesquisas revelam que o D-Limoneno apresenta elevados efeitos inibitórios em relação aos microrganismos *E. coli*, *S. aureus* e *B. subtilis* e a combinação desse composto com nisina apresentou efeitos sinérgicos e aditivos frente as cepas testadas, como também efeitos antagonísticos e de indiferenças foram observados, porém a combinação de D-Limoneno com a nisina resultou em um alto efeito antimicrobiano. Desse modo, pôde concluir que a aplicação combinada fornece um método antimicrobiano mais eficaz para a produção, processamento, serviço e consumo de alimentos e bebidas [23].

Por meio de diferentes metodologias, Yao *et al.* [18] demonstraram que os filmes comestíveis de gelatina-quitosana de peixe suplementado com o D-Limoneno revelou forte atividade antibacteriana contra *E. coli*. Como também, a incorporação do mesmo no filme de gelatina-quitosana de peixe melhorou a resistência à penetração de água e luz e a ductilidade.

Dessa forma, utilizar o R-(+)-Limoneno evidencia potenciais vantagens como antimicrobiano natural dentro de revestimento comestível, atuando como conservantes e melhorando a segurança, qualidade e propriedades nutricionais dos alimentos, pois foi investigada a eficácia das emulsões do R-(+)-Limoneno na diminuição do crescimento de microorganismos através da difusão de seus componentes ativos voláteis e constatou que os revestimentos de R-(+)-Limoneno mostrou eficácia na descontaminação dos patógenos externos *E. Coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*, como também preservou a aparência dos morangos por mais tempo, estendendo sua vida útil [20].

Nesse cenário, Lan *et al.* [21] demonstraram que a adição de D-Limoneno melhorou a atividade antibacteriana dos filmes contendo PVA/CS contra: *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, o composto PVA/CS/DL-5% prolongou a vida útil da manga apresentando uma taxa de decomposição inferior a 20% após 10 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Desse modo, este estudo indicou que os filmes de PVA/CS incorporados com DL podem ser promissores como um material de embalagem ecológico para preservação de alimentos, devido à sua considerável biodegradabilidade, propriedades mecânica e atividade antibacteriana.

Em estudo com o D-Limoneno encapsulado em lipossoma demonstrou uma boa estabilidade física e forte atividade antimicrobiana *in vitro* contra as cepas testadas e o mesmo reduziu a perda de armazenamento do mirtilo em um terço, no período de nove semanas. Logo, D-Limoneno encapsulado em lipossoma como um revestimento comestível, pode ser uma boa alternativa de tratamento pós-colheita para estender a vida de armazenamento de bagas em curta temporada [24].

Conforme, Roy e Rhim [25] os filmes contendo CuSNP e DL em sua formação mostrou alguma atividade antibacteriana contra as cepas testadas *E. coli* e *L. monocytogenes*, porém a atividade antibacteriana de CuSNP foi mais eficaz em comparação com DL, onde o mesmo mostrou ser eficaz apenas contra *E. coli*. Portanto, os filmes apresentam efeito antimicrobiano contra os agentes patogênicos alimentares e pode ser usado para controlar o crescimento do microorganismo em alimentos embalados, porém são necessárias pesquisas adicionais.

Em ensaios de avaliação da CIM e CBM do D-Limoneno livre (L) e D-Limoneno carregado com nanoesponjas (L-NS) contra quatro bactérias *E. coli*, *Shigella flexneri*, *S. aureus* e *Enterococcus*. Os valores da CIM e CBM para L-NS foram significativamente menores em comparação com L livre sendo indicativo que nanoesponjas com ciclodextrinas (CD-NS) pode elevar o potencial efeito antibacteriano de L. O maior efeito da atividade antimicrobiana e a liberação controlada de L encapsulado de CD-NS, sugerem que os mesmos têm um potencial como agente antimicrobiano para uso em embalagens de alimentos ou formulações de alimentos [29].

CONCLUSÃO

Analisando as evidências de todos os estudos mencionados, pode-se concluir que o terpeno R-(+)-Limoneno pode ser considerado como uma substância promissora para o combate de doenças causadas por bactérias patogênicas. No entanto, mais estudos são necessários para aprofundar o mecanismo de ação, bem como, frente a maior quantidade de espécies bacterianas isoladas de diferentes origens, a fim de se compreender de forma mais eficaz esse efeito biológico encontrado.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. T.W. Mak, M.E. Saunders, B.D. Jett, *Primer to the Immune Response*, 2nd ed., Elsevier, 2014, pp. 295-332.
2. M. Haque, M. Sartelli, J. McKimm, M.A. Bakar, Health care-associated infections: An overview, *Infection and drug resistance*, **11**, 2321-2333 (2018).
3. W. Evinson, *Microbiologia médica e imunologia*, 13^a ed., AMGH, Porto Alegre, 2016.
4. G.J. Tortora, B.R. Funke, C.L. Case, *Microbiologia*, 12^a ed., Artmed, São Paulo, 2016.
5. A.L.P da Costa, A.C.S.S. Junior, Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura, *Estação Científica (UNIFAP)*, **7**(2), 45-57 (2017).
6. R.J. Loureiro, F. Roque, A.T. Rodrigues, M.T. Herdeiro, E. Ramalheira, O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução, *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, **34** (1), 77-84 (2016).
7. A. Kamenshchikova, P.F.G. Wolffs, C.J.P.A. Hoebe, K. Horstman, Anthropocentric framings of One Health: an analysis of international antimicrobial resistance policy documents, *Critical Public Health*, **31**(3), 306-315 (2021).

8. M Bassetti, M. Merelli, C. Temperoni, A. Astilean, New antibiotics for bad bugs: Where are we? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **12**, 22 (2013).
9. H.N. Veras, F.F. Rodrigues, M.A. Botelho, I.R. Menezes, H.D. Coutinho, J.G. Costa, Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol, *Arabian Journal of Chemistry*, **10**, S2790-S2795 (2017).
10. L.O. Felipe, J.L. Bicas, Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais, *Química Nova na Escola*, **39**(2), 120-30 (2017).
11. A.J. Vieira, F.P. Beserra, M.C. Souza, B.M. Totti, A.L. Rozza, Limonene: Aroma of innovation in health and disease, *Chemico-Biological Interactions*, **283**, 97-106 (2018).
12. L. Espina, M. Somolinos, S. Lorán, P. Conchello, D. García, R. Pagán, Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes, *Food Control*, **22**(6), 896-902 (2011).
13. J. H Schween, R. Dlugi, C.N. Hewitt, P. Foster, Determination and accuracy of VOC-fluxes above the pine/oak forest at Castelporziano, *Atmospheric Environment*, **31**, 199-215 (1997).
14. A. Bevilacqua, M.R. Corbo, M. Sinigaglia, *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of eugenol, limonene, and citrus extract against bacteria and yeasts, representative of the spoiling microflora of fruit juices, *Journal of Food Protection*, **73**(5), 888-894 (2010).
15. A.C.F.R. Valeriano, E.X. Silva Júnior, C.N.G. Bedor, M.M. Costa, O uso da fitoterapia na medicina por usuários do SUS, Uma revisão sistemática, *Id on Line Revista Multidisciplinar e de Psicologia*, **10**, 219-236 (2017).
16. D. Moher, L. Shamseer, M. Clarke, Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA -P) 2015 statement, *Systematic Reviews*, **4**(1), 1 (2015).
17. M.D.S. Costa, J.E. Rocha, F.F. Campina, A.R. Silva, R.P. da Cruz, R.L. Pereira, H.D. Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of d-limonene alone and complexed with β -cyclodextrin, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **128**, 158-161 (2019).

18. Y. Yao, D. Ding, H. Shao, Q. Peng, Y. Huang, Antibacterial activity and physical properties of fish gelatin-chitosan edible films supplemented with D-Limonene, *International Journal of Polymer Science*, **2017**, 1837171 (2017).
19. E.G. da Silva, G. Bandeira Junior, J.F. Cargnelutti, R.C.V. Santos, A. Gündel, B. Baldisserotto, In vitro antimicrobial and antibiofilm activity of S-(-)-Limonene and R-(+)-Limonene against fish bacteria, *Fishes*, **6**(3), 32 (2021).
20. P. Shao, H. Zhang, B. Niu, L. Jiang, Antibacterial activities of R-(+)-Limonene emulsion stabilized by *Ulva fasciata* polysaccharide for fruit preservation, *International Journal of Biological Macromolecules*, **111**, 1273-1280 (2018).
21. W. Lan, S. Wang, M. Chen, D.E Sameen, K. Lee, Y Liu, Developing poly(vinyl alcohol)/chitosan films incorporate with d-limonene: Study of structural, antibacterial, and fruit preservation properties, *International Journal of Biological Macromolecules*, **145**, 722-732 (2020).
22. J. Su, Q. Guo, Y. Cai, T. Wang, L. Mao, Y Gao, P. Van der Meeren, Effect of ultra-high temperature processing on the physicochemical properties and antibacterial activity of d-limonene emulsions stabilized by β -lactoglobulin/Gum arabic bilayer membranes, *Food Chemistry*, **332**, 127391 (2020).
23. Z. Zhang, F. Vriesekoop, Q. Yuan, H. Liang, Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion, *Food Chemistry*, **150**, 307-312 (2014).
24. A.L. Umagiliyage, N. Becerra-Mora, P. Kohli, D.J. Fisher, R. Choudhary, Antimicrobial efficacy of liposomes containing d-limonene and its effect on the storage life of blueberries, *Postharvest Biology and Technology*, **128**, 130-137 (2017).
25. S. Roy, J.W. Rhim, Fabrication of copper sulfide nanoparticles and limonene incorporated pullulan/carrageenan-based film with improved mechanical and antibacterial properties, *Polymers*, **12**(11), 2665 (2020).
26. W. Lan, X. Liang, W Lan, S. Ahmed, Y. Liu, W. Qin, Electrospun polyvinyl alcohol/d-limonene fibers prepared by ultrasonic processing for antibacterial active packaging material, *Molecules*, **24**(4), 767 (2019).
27. L. Guo, Y.Q. Fang, X.R. Liang, Y.Y. Xu, J. Chen, Y.H. Li, Y.C. Meng, Influence of polysorbates (Tweens) on structural and antimicrobial properties for micro-emulsions, *International Journal of Pharmaceutics*, **590**, 119939 (2020).

28. M.M. Mehanna, A.T. Mneimneh, K. Abed El Jalil, Levofloxacin-loaded naturally occurring monoterpene-based nanoemulgel: a feasible efficient system to circumvent MRSA ocular infections, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **46** (11), 1787-1799 (2020).
29. O. Salehi, M. Sami, A Rezaei, Limonene loaded cyclodextrin nanosponge: Preparation, characterization, antibacterial activity and controlled release, *Food Bioscience*, **42**, 101193 (2021).
30. E. Sieniawska, R. Sawicki, M. Swatko-Ossor, A. Napiorkowska, A. Przekora, G. Ginalska, E. Augustynowicz-Kopec, The effect of combining natural terpenes and antituberculous agents against reference and clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains, *Molecules*, **23**(1), 176 (2018).
31. G.W. Lee, M.S. Chung, M. Kang, B.Y. Chung, S. Lee, Direct suppression of a rice bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) by monoterpene (S)-limonene, *Protoplasma*, **253**(3), 683-690 (2016).

COMO CITAR ESTE ARTIGO

M. de Souza-Alves, M.A. Araújo de Medeiros, A. Alves de Oliveira-Filho, Atividade antibacteriana do R-(+)-Limoneno: uma revisão sistemática, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 51(2), 1255-1272 (2022). <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v51n3.100584>