

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO MONOTERPENO CITRAL CONTRA CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE ESBL.

Maria Alana Neres de Pontes¹

Igara Oliveira Lima¹

¹Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)-Campus Cuité-PB¹

E-mail: alaninha_pontes@hotmail.com

E-mail: igaralima@gmail.com

Resumo: Devido ao crescimento desenfreado da automedicação, vários microrganismos vem desenvolvendo mecanismos de resistência com maior frequência, desta forma tornando o tratamento cada vez mais difícil, sendo necessária a pesquisa de novas alternativas terapêuticas mais eficientes. Diversos produtos naturais têm sido estudados, a exemplo dos óleos essenciais e dos monoterpenos que vem apresentando ação bastante promissora frente aos microrganismos. Nessa perspectiva, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antibacteriana do fitoconstituente citral contra as cepas de *K. pneumoniae* produtora de ESBL e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) deste monoterpeno. Para isso, foi realizada a técnica de microdiluição seriada a uma razão de dois, onde se reservou a última coluna para o controle do crescimento microbiano, testando assim também a viabilidade do meio de cultura utilizado. No entanto, através dos experimentos realizados, notou-se que o monoterpeno citral não inibiu o crescimento das cepas de *K. pneumoniae*, assim não apresentando atividade antibacteriana contra as mesmas.

PALAVRAS-CHAVE: *Klebsiella pneumoniae*, atividade antimicrobiana, citral.

Introdução

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo, membro da família Enterobacteriaceae, que podem ser encontrados em ambientes como solo, água e plantas (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; CERQUEIRA et al., 2011). A referente

espécie faz parte da microbiota intestinal normal e sua virulência está associada à presença de uma cápsula polissacarídica, onde se trata de um sistema de captação de ferro, fenótipo mucoide e lipopolissacarídeo tóxico (PFALLER, 2006). Os locais mais comuns de infecção, são os tratos urinário e respiratório,

podendo também encontrar diversas quantidades de bactérias no sangue, ou seja, bacteremia. As infecções causadas por esta espécie também estão correlacionadas com pacientes que se encontra com seu sistema imunológico debilitado, assim sendo um fator favorável no desenvolvimento de doenças (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; CERQUEIRA et al., 2011).

O número de surtos hospitalares causados por *K. pneumoniae* vem aumentando cada vez mais com a mudança no padrão de sensibilidade, e isso se deve ao uso indiscriminado dos antimicrobianos de amplo espectro e monobactâmicos, principalmente cefalosporina de terceira geração, onde esse uso na maioria dos casos se dá pela automedicação desenfreada (SCARPATE & COSSATIS, 2009). Um dos mecanismos de importância relevante é a produção de betalactamases, onde são enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta geração, assim as transformando para sua forma inativa, destacando-se a produção de betalactamases de amplo espectro. (SILVA; LINCOPAN 2012, GUPTA et al, 2003).

O mecanismo de resistência citado baseia-se na produção de um grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise do anel betalactâmico, recebendo-se a denominação de betalactamases de amplo espectro, por

conferirem resistência a uma ampla variedade de fármacos (SILVA et al., 2012).

Devido à inefetividade das principais formas de tratamento contra infecções bacterianas de cepas produtoras de ESBL, pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de investigar novos fármacos com ação antimicrobiana ou ainda, moléculas que modulam a atividade de antibióticos, onde se pode constatar o grande potencial dos produtos naturais como agentes antibacterianos (COUTINHO et al., 2008; VERAS et al., 2013).

Produtos naturais vem demonstrando uma grande eficiência nas infecções bacterianas, onde com isso só justifica a grande variedade de drogas oriundas desses produtos naturais que vem aumentando devido esses benefícios que os mesmos apresentam (FERNEBRO, 2011). Nesta perspectiva, cada vez mais pesquisas vem sendo desenvolvidas com o intuito de investigar novos fármacos com ação antimicrobiana ou ainda, se possível, moléculas que modulem a atividade de antibióticos (COUTINHO et al., 2008; VERAS et al., 2013).

Terpenos são os principais compostos de óleos essenciais das plantas aromáticas, a exemplo do citral (geranial e neral), que se trata de um monoterpene acíclico e aldeído,

onde é encontrado em diversas plantas, possuindo diversas atividades biológicas, dentre elas e em especial, a ação antimicrobiana. Essa ação antimicrobiana do citral foi comprovada por Saddiq e Khayyat (2010) frente às cepas de *Staphylococcus aureus* metilina resistente, *Penicillium italicum* e *Rhizopus stolonifer*, onde utilizaram o método de difusão em ágar (SADDIQ; KHAYYAT, 2010).

Desta forma, pelo monoterpeno citral ser uma molécula promissora, o presente trabalho teve como objetivo testar a atividade antimicrobiana do mesmo frente às cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, em busca de alternativas terapêuticas que possam contribuir para o impacto que vem sendo causado devido o surgimento de cepas multirresistentes, no atual panorama em que a saúde mundial se encontra.

Metodologia

Local de Trabalho

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Microbiologia (J11) no Centro de Educação e Saúde / Universidade Federal de Campina Grande.

Cepas Bacterianas e Substâncias

Para a realização do trabalho, serão utilizadas cepas bacterianas de *K. pneumoniae* ESBL (A-363, A-368, 73, 23, C-46 e LJ-09),

e foram doadas pela farmacêutica Bernadete Helena Cavalcanti Santos (Laboratório de Microbiologia Clínica/Departamento de Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal da Paraíba).

Fitoconstituente

O fitoconstituente testado será o citral (Sigma Aldrich). Serão utilizados o Tween 80 e o DMSO para auxiliar na solubilização do monoterpeno citral. Todas as substâncias relatadas foram adquiridas comercialmente e se encontram no local de pesquisa.

Inoculo

O inoculo foi ajustado de acordo com a escala de 0,5 Mc Farland em suspensão do microrganismo em solução salina 0,85%, sendo diluído até atingir a concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM dos fitoconstituintes selecionados foi realizada pela técnica da microdiluição em Placa de 96 orifícios e fundo em “U” para cada uma das cepas. Através da diluição seriada a uma razão de 2, foram obtidas as concentrações de 10²⁴ a 1 µg/mL, efetuadas na própria placa, da coluna 1 até a 11. A última coluna (12) foi reservada para o controle de crescimento do microrganismo (caldo

Mueller Hinton, sem o produto testado). Foi realizado o controle para observar a viabilidade da cepa (caldo e cepa) e controle de esterilidade (caldo) (CLSI, 2005; SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007; HUSSAIN et al., 2011).

Em seguida, foi adicionado 10µL do inoculo (bactéria a 0,5 McFarland) em cada uma das cavidades. O ensaio foi realizado em triplicata e incubado a 37°C no período de 24 horas para *K. pneumoniae*. Após o tempo de incubação adequado, 20 µL resazurina a 1% (SIGMA), indicador colorimétrico de óxido-redução para bactérias foi adicionado e a leitura procedida, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo através da observação da mudança da coloração da solução de azul para rosa/vermelho, resultante do crescimento do microrganismo. Portanto, foi determinada como CIM, a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento do microrganismo ensaiado, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador (CLSI, 2005; SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007; HUSSAIN et al., 2011).

Resultados e Discussão

Com os constantes aumentos de meios de resistência ao qual as bactéria têm

apresentado, sendo a maior parte resultante da automedicação desenfreada pelos próprios pacientes, o combate à resistência microbiana acaba sendo uma grande preocupação por parte da Organização Mundial de Saúde. Com isso para o desenvolvimento de ações de controle e prevenção da resistência é necessário que haja uma preocupação maior direcionada às áreas de educação, incluindo o uso racional de antimicrobianos, de pesquisa e de estudos de vigilância (WOLLHEIM et al., 2009). Dessa forma os programas de pesquisas têm realizado descobertas que viabilizam alternativas terapêuticas secundárias contra os mecanismos de resistência desses patógenos, tentando solucionar preocupações que assolam o atual panorama da saúde mundial.

Segundo um estudo de Santos et al. (2009), o citral apresentou ação antimicrobiana contra cepas de alguns fungos, como *Cândida albicans* e *tropicalis* e também contra algumas bactérias, tanto gram positivas, como o *Staphylococcus aureus*, como também gram negativas, a exemplo da *Pseudomonas aeruginosa* e da *Escherichia coli*, sendo essa última parte da mesma família da *Klebsiella pneumoniae* estudada no presente trabalho.

A tabela 1 ilustra os resultados referentes à ação antibacteriana do citral contra as cepas de *K. pneumoniae*, onde houve crescimento

da bactéria em todos os níveis de concentrações aplicadas, assim não apresentando nenhuma concentração inibitória mínima (CIM) do monoterpene estudado, logo não ocorrendo ação antibacteriana frente as cepas.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM em µg/mL) do citral contra cepas de *K. pneumoniae*.

	<i>K. pneumoniae</i> A-343	<i>K. pneumoniae</i> A-338	<i>K. pneumoniae</i> 73	<i>K. pneumoniae</i> 13	<i>K. pneumoniae</i> C-46	<i>K. pneumoniae</i> LJ-10
1024 µg/ml		+	+			+
512 µg/ml		+	+			+
256 µg/ml		+	+			+
128 µg/ml	-	+	+	-	-	+
64 µg/ml		+	+			+
32 µg/ml	-	+	+	-	-	+

Conclusão

Através dos experimentos realizados no presente estudo, notou-se que o fitoconstituente citral não inibiu o crescimento das cepas de *K. pneumoniae*, assim não apresentando atividade antibacteriana contra as mesmas. Portanto, devido à importância da contribuição dos óleos essenciais e sua atividade antimicrobiana comprovada em alguns micro-organismos, se faz necessário mais estudos pela busca de novas alternativas para o combate de bactérias multirresistente.

Referências Bibliográficas

ALVES AP, BEHAR PR. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Rev AMRIGS**. 2013;57(3):213-8.

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.

CERQUEIRA, A, S; MACHADO, P; MARTO, J; LITO L; MELO-CRISTINO, J; DUARTE A. Persistência de *Klebsiella pneumoniae* em doentes de unidades pediátricas do Hospital de Santa Maria, em Lisboa. **Acta Pediátrica**, v. 42, p.49-53, 2011.

CLSI M7-A6. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos para Bactérias de Crescimento Aeróbio: Norma Aprovada – Sexta Edição. Vol. 23. 2005.

COUTINHO, H.D.M., COSTA, J.G.M., LIMA, E.O., FALCAO-SILVA, V.S., SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. In vitro interference of *Momordica charantia* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 1056–1059, 2008.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytoterapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.

EFTEKHAR, F.; ZAMANI, S.; YUSEFZADI, M.; HADIAN, J.; EBRAHIMI, S. N. Antibacterial activity of *Zataria multiflora* Boiss essential oil against extended spectrum lactamase produced by urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Jundishapur journal of microbiology**. v.4, p.43-49, 2011.

FERNEBRO, J. Fighting bacterial infections - Future treatment options. **Drug Resistance Updates.**, v. 14 , p. 125–139,2011.

FONSECA, Francisco Noé da. Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis*-Chambá : obtenção do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica. 2009. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

GUPTA, A.; AMPOFO, K.; RUBENSTEIN, D.; SAIMAN, L. Extended Spectrum β Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature. **Journal of Perinatology**. V. 23, P. 439–443, 2003.

HELANDER, IKKA M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; NIGAM, P.S.; SARKER, S.D.; MOORE, J.E. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1199-1206, 2011.

MUÑOZ, M., GUEVARA, L., PALOP, A., & FERNÁNDEZ, P. S. (2010). Prediction of time to growth of *Listeria monocytogenes* using Monte Carlo simulation or regression analysis, influenced by sublethal heat and recovery conditions. **Food Microbiology**, 27(4), 468e475.

MURRAY, PR, ROSENTHAL, KS, PFALLER, MA. Enterobacteriaceae. In: Schmitt W, DeFrancesco K, editors. Medical Microbiology. 6th ed. **Philadelphia: Elsevier Mosby**; 2009; 301-15.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.;CARDOSO, M.G.;ALVES, E.A.; PICCOLI, R.H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 549-553, 2010.

PFALLER AM, JONES RN, DOERN GV, KUGLER K. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). **Antimicrob Agent Chemother** 1998; 42:1762-70.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, R. Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p. 589-603, 1998.

PETROSINO, J.; CANTU, C.; PALZKILL, T. -Lactamases: protein evolution in real time. **Trends Microbiology**. v.6, n. 2, p 323-327, 1998.

RATTANACHAIKUNSOPON, P., PHUMKHACHORN, P. (2010). Assessment of synergistic efficacy of carvacrol and cymene against *Edwardsiella tarda* in vitro and in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **African Journal of Microbiology Research**, 4(5), 420e425.

SADDIQ, A.A.; KHAYYAT, S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 89-93, 2010.

SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2, p. 436-441, 2009.

SARKER, S.D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v.42, p. 321-324, 2007.

SCHUCK, V. J., FRATINI, M., RAUBER, C. S., HENRIQUES, A., & SCHAPOVAL, E. E. (2001) Virna JA et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Braz J Pharm Sciences**, v. 37, n. 1, p. 45-9, 2001.

SILVA, F. de L.; SUGAUARA, E. Y. Y.; MAGALHÃES, H. M.; PASCOTTO, C. R.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A.; GAZIM, Z. C. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama**, v. 17, n. 3, p. 181-184, jul./set. 2014.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e

implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 48, n. 2, p. 91-99, abril 2012.

SCHWABER MJ, CARMELI Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bac-teremia: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 913–20, .2007.

SCARPATE, E. C. B; COSSATIS, J. J. A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de - lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. **Saúde & Ambiente**. v.4, p.1-11, 2009.

SKANDAMIS, P., TSIGARIDA, E., & NYCHAS, G. J. E. (2002). The effect of oregano essential oil on survival/death of Salmonella Typhimurium in meat stored at 5 C under aerobic, VP/MAP conditions. **Food Microbiology**, 19(1), 97e103.

SOMOLINOS, M., GARCÍA, D., CONDÓN, S., MACKEY, B., & PAGÁN, R. (2010). Inactivation of Escherichia coli by citral. **Journal of Applied Microbiology**, 108(6), 1928e1939.

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.

SZENTANDRASSY, N.; SZIGETI, G.; SZEGEDI, C.; SARKOZI, S.; MAGYAR, J.; BANYASZ, T.; CSERNOCH, L.; KOVACS, L.; NANASI, P.P.; JONA, I. Effect of thymol on calcium handling in mammalian ventricular myocardium. **Life Sci.**, v. 74, p. 909–921, 2004.

TUMBARELLO, M.; SPANU, T.; DI BIDINO, R.; MARCHETTI, M.; RUGGERI, M.; TRECARICHI, E.M.; DE PASCALE, G.; PROLI, E.M.; CAUDA, R.; CICHETTI, A.; FADDA, G. Costs of bloodstream infections caused by Escherichia coli and influence of extended-spectrum-beta-lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.54, p. 4085–4091, 2010.

ULTEE, A., KETS, E. P. W., & SMID, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. **Applied and Environmental Microbiology**, 65(10), 4606e4610.

VERAS, H.N.H.; RODRIGUES, F.F.G.; BOTELHO, M.A.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M. Enhancement of aminoglycosides and b-

lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian Journal of Chemistry** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.030>

WOLLHEIM C., Epidemiologia molecular de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* Produtoras de beta-lactamases de espectro ampliado, Dissertação de mestrado. Universidade de Caxias do Sul; Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2009.