



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE  
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE  
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

**MARIA ALANA NERES DE PONTES**

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DO MONOTERPENO CITRAL  
FRENTE AS CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE ESBL**

**CUITÉ – PB**

**2017**

MARIA ALANA NERES DE PONTES

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DO MONOTERPENO  
CITRAL FRENTE AS CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE ESBL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Igara Oliveira Lima

**CUITÉ – PB**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE  
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

P814a Pontes, Maria Alana Neres de.

Investigação da ação antibacteriana do monoterpeneo citral frente as cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. / Maria Alana Neres de Pontes. – Cuité: CES, 2017.

47 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2017.

Orientadora: Igara Oliveira Lima.

1. Antifúngicos. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Citral. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 615.281.9

MARIA ALANA NERES DE PONTES

**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DO MONOTERPENO  
CITRAL FRENTE AS CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE ESBL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Bacharelado em Farmácia da  
Universidade Federal de Campina Grande,  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Igara Oliveira Lima  
(Orientadora) – UFCG

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francinalva Dantas de Medeiros  
(Examinadora) – UFCG

---

Dr.<sup>a</sup> Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira  
(Examinadora) – HUAB

*Dedico este trabalho ao meu Deus que me proporcionou toda sabedoria possível. Aos meus pais Lena e Aristeu, por serem meu porto seguro e, onde sempre pude achar forças para seguir. Aos meus irmãos Alessandro, Adriano e Alan que não deixaram de acreditar em mim. As minhas duas sobrinhas Maria Cecília e Mariana que são minhas fontes de inspiração. E ao meu companheiro Diogo que sempre esteve presente com muita paciência, compreensão e amor, me incentivando e colaborando para a realização deste sonho. Essa vitória é nossa!*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, pelo dom e milagre da vida, pelo dom da sabedoria, pelo o teu amor, pelas imensuráveis bênçãos que tem derramado em minha vida, pela companhia, fé e perseverança, por não ter me abandonado e pela força de vontade para que o sentimento de desistir não persistisse em mim. Se hoje, realizo este sonho, que não é só meu, mas de toda minha família, é graças a ti senhor. Obrigada pai!

Segundo, agradeço aos meus pais, **Geralda Farias Neres de Pontes** e **José Teixeira de Pontes**, por todo amor e carinho, incentivo, dedicação, apoio, pela simplicidade, por não medirem esforços na realização dos meus estudos, pela boa criação, exemplo e educação, sendo fundamentais na construção do meu caráter. Obrigada, mainha por sempre estar comigo, por torcer ao meu lado, por sempre ter acreditado em mim, quando nem eu mesma acreditava, por ser essa mãe e amiga maravilhosa que tenho, que mesmo com todas as minhas falhas, não me abandonou e sempre esteve presente, mesmo estando distante. Amo vocês!

Aos meus irmãos **José Alessandro Neres de Pontes**, **José Adriano Neres de Pontes** e **José Alan Neres de Pontes**, por compartilharem do mesmo sonho, por todo o apoio, cuidado, incentivo e por sempre acreditarem em mim. Grata a Deus, por ter me presenteado irmãos como vocês. Amo vocês!

Agradeço as minhas cunhadas e amigas **Jéssica** e **Gilmara** por toda compreensão, força e apoio que me repassaram durante toda minha trajetória, onde sempre pude achar incentivo e colaboração para a realização deste sonho. Sou grata a Deus por tê-las em minha vida. Amo vocês!

Ao meu esposo, **Diogo Venâncio Coura**, que sempre esteve presente durante toda a minha jornada. Obrigada por todo companheirismo, por todo cuidado, pelo amor, paciência e por sempre me trazer paz e tranquilidade na correria de cada semestre. Sou imensamente grata a Deus, por ter te colocado em minha vida. Obrigada por tudo!

Agradeço em especial a minha orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Igara Oliveira Lima**, pelo acolhimento ao me receber no grupo de pesquisa, pela confiança, pela paciência, dedicação e os conhecimentos compartilhados na produção deste trabalho. Obrigada por toda orientação e amizade, sou eternamente grata por acreditar em mim!

Agradeço a todos os professores do curso, por todos os ensinamentos, dedicação, e experiências compartilhadas, assim contribuindo não só para minha vida profissional como pessoal; e a todos os funcionários dos diversos setores do **Centro de Educação e Saúde**, pela infraestrutura, e por manter sempre o campus em condições confortáveis.

Ao grupo de pesquisa em microbiologia, em especial **Dijaci Santos de Lima** e **Anna Paula de Castro Teixeira**, pelo companheirismo, amizade e colaboração com os experimentos, durante toda a trajetória.

À farmacêutica da UFPB/ DCF/CCS **Bernadete Helena Cavalcanti Santos**, por ter cedido as cepas do microrganismo testado, viabilizando este estudo.

À professora **Dr<sup>a</sup>. Francinalva Dantas de Medeiros** e a Farmacêutica-Bioquímica **Dr<sup>a</sup>. Heloísa Mara Batista Fernandes de Oliveira**, por aceitarem o convite de compor a banca avaliadora e pelas contribuições para este trabalho.

As minhas companheiras de casa, **Sabrina Kayne, Maisa Lucena, Ruana Carolina**. Obrigada por todo companheirismo, colo e apoio, pelas melhores risadas, aventuras e lições que levarei para a vida. Estarão sempre em minhas lembranças. Obrigada por tudo!

As minhas grandes amizades que Cuité me presenteou **Maisa Lucena, Géssica Tavares, Sabrina Kayne e Suamy Rabelo**, que sempre estiveram ao meu lado, me consolando, aconselhando, chorando comigo e ajudando durante toda essa minha trajetória. Obrigada por cada momento, por sempre me apoiarem e estarem comigo nos melhores anos da minha vida!

Aos melhores amigos e colegas de curso, em especial a **Dijaci Lima**, aonde acredito que já estava nos planos de Deus nos encontrarmos em Cuité, e assim nos tornamos grandes amigos, parceiros, dividindo momentos, compartilhando histórias e segredos durante esses 5 anos de curso. Obrigada por tudo, pela confiança, lealdade, puxões de orelha, e por sempre me ajudar, não só na graduação como na vida. Que esse laço tão forte que nos envolveu neste convívio de curso, jamais seja desfeito.

Aos meus amigos de faculdade, **Michael Torres, Francielly Simões, Neves Neta**, que levarei sempre no meu coração, pois não poderia esquecer de todos os nossos momentos, histórias, angústias e risadas, do colo que sempre me ajudou e consolou durante os momentos de dificuldades. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos de longas datas, desde a infância e adolescência, **Camila Bastos, Luana Cristina, Ellen Gregório, Mirian Cavalcante, Isabelle Christine, Tancredo Regis, Fabiolange Farias, Hellen Lustosa, Rayssa Fernandes**, por todo o apoio, cumplicidade, por compreenderem minha ausência, pela amizade e por sempre torcerem por mim. Muito obrigada!

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta colaboraram e contribuíram para esta conquista.

*“Acredite é hora de vencer. Essa força vem de dentro de você. Você pode até tocar o céu, se crer”.*

*(Jamile)*



## RESUMO

A *Klebsiella pneumoniae* trata-se de um bacilo gram-negativo membro da família Enterobacteriaceae, em que apresentam como seus principais sítios de ação o trato respiratório e urinário. Diante do crescimento desenfreado da automedicação, vários microrganismos tem desenvolvido mecanismos de resistência com maior frequência, desta forma torna o tratamento cada vez mais difícil, sendo necessária a pesquisa por novas alternativas terapêuticas mais eficientes. Diversos produtos naturais vem sendo estudados, a exemplo dos óleos essenciais e dos monoterpenos que tem apresentado ação bastante promissora frente a um grande número de microrganismos. Nessa perspectiva, este trabalho teve como objetivo investigar a atividade antimicrobiana do citral contra as cepas de *K. pneumoniae* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) deste monoterpeno. Para isso, foi realizada a técnica de microdiluição seriada a uma razão de dois, partindo-se de uma concentração de 2040 µg/mL, e utilizou como meio de cultura o caldo Brain Heart Infusion, sendo reservada a última coluna para o controle do crescimento microbiano, onde testou -se também a viabilidade do meio de cultura. Os experimentos foram preparados em triplicata e em seguida incubados na estufa a uma temperatura de  $37\text{ C}^{\circ} \pm 2\text{ C}^{\circ}$ , por um período de 24 horas, onde a avaliação dos ensaios foi realizada, por meio do método visual, utilizando a resazurina como indicador colorimétrico do crescimento. No entanto, através dos experimentos realizados, notou-se que o monoterpeno citral não inibiu o crescimento das cepas de *K. pneumoniae* nas condições e concentrações testadas. Dessa forma, observou-se que a partir dos estudos realizados o fitoconstituente não apresentou atividade antibacteriana contra as cepas testadas.

**Palavras-chaves:** *Klebsiella pneumoniae*, atividade antimicrobiana, citral.

## ABSTRACT

*Klebsiella pneumoniae* is a gram-negative bacillus member of the family Enterobacteriaceae, in which the main sites of action are the respiratory and urinary tract. In the face of the unbridled growth of self-medication, several microorganisms have developed mechanisms of resistance with greater frequency, in this way to make the treatment increasingly difficult, being necessary the research for new therapeutic alternatives more efficient. Several natural products have been studied, such as essential oils and monoterpenes, which have shown a very promising action against a large number of microorganisms. In this perspective, the objective of this work was to investigate the antimicrobial activity of citral against ESBL-producing strains of *K. pneumoniae* and to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of this monoterpene. For this purpose, the serial microdilution technique was performed at a ratio of two, starting at a concentration of 2040 µg / mL, and used the Brain Heart Infusion broth as the culture medium, with the last column being reserved for growth control microbial, where it also tested the viability of the culture medium. The experiments were prepared in triplicate and then incubated in the oven at a temperature of  $37\text{ C}^{\circ} \pm 2\text{ C}^{\circ}$  for a period of 24 hours where the evaluation of the assays was performed using the visual method using resazurin as an indicator colorimetric method of growth. However, through the experiments performed, it was noted that citral monoterpene did not inhibit the growth of *K. pneumoniae* strains under the conditions and concentrations tested. Thus, it was observed that from the studies performed the phyto-constituent did not present antibacterial activity against the strains tested.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial activity, citral.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura da <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	17
<b>Figura 2</b> - <i>K. pneumoniae</i> cultivada no meio ágar MacConkey.....	18
<b>Figura 3</b> - Mecanismo de resistência bacteriana a alguns antimicrobianos.....	20
<b>Figura 4</b> - Representação do mecanismo de hidrólise de antibióticos.....	21
<b>Figura 5</b> - Estrutura química dos isômeros do citral.....	26
<b>Figura 6</b> - <i>Cymbopogon citratus</i> .....	26
<b>Figura 7</b> - Preparo da emulsão contendo o fitoconstituente.....	27
<b>Figura 8</b> - Preparo do inóculo.....	28

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Compostos terpenoides.....	24
--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Concentração Inibitória Mínima (CIM em $\mu\text{g/ml}$ ) do citral contra cepas de <i>K. pneumoniae</i> .....	30
--	----

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

C – Carbono

°C – Graus Celsius

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DCF – Departamento de Ciências Farmacêuticas

*E.coli* – *Echerichia coli*

ESBL – Beta-Lactamases de Espectro Estendido

Et. al – e outros

*K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*

KPC – *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase

mL – Mililitro

N – Nitrogênio

P – Enxofre

TSI - Tríplice açúcar ferroso

UFC – Unidades formadoras de colônias

µg – Microgramas

µL – Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
3.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	17
3.1.1 Tratamento utilizado para <i>K. pneumoniae</i> .....	18
3.2 Resistência bacteriana.....	19
3.2.1 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) .....	20
3.3 Epidemiologia das infecções hospitalares causadas por <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL.....	21
3.4 Produtos naturais .....	23
3.4.1 Óleos essenciais.....	23
3.4.2 Terpenos .....	24
3.4.3 Citral .....	25
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
4.1 Local de trabalho .....	27
4.2 Cepas bacterianas e meio de cultura.....	27
4.3 Citral .....	27
4.4 Inóculo .....	28
4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	29
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Klebsiella pneumoniae* é um bacilo gram-negativo, membro da família Enterobacteriaceae, que pode ser encontrado em ambientes como solo, água, e plantas (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; CERQUEIRA et al., 2011). A referente espécie faz parte da microbiota intestinal humana e sua virulência está associada à presença de uma cápsula polissacarídica, composta por um sistema de captação de ferro, fenótipo mucoide e lipopolissacarídeo tóxico quando em outros sítios (TG, pulmão, corrente sanguínea, entre outros) (PFALLER, 2006).

O número de surtos hospitalares causados por *K. pneumoniae* tem aumentado cada vez mais com a mudança no padrão de sensibilidade, onde deve-se ao uso indiscriminado dos antimicrobianos de amplo espectro e monobactâmicos, principalmente a cefalosporinas de terceira geração, que na maioria dos casos se dá pela automedicação desenfreada (SCARPATE; COSSATIS, 2009).

Um dos mecanismos de importância relevante é a produção de betalactamases, que são enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira e quarta geração, assim transformando esses fármacos para sua forma inativa, destacando-se a produção de betalactamases de amplo espectro (GUPTA et al., 2003; SILVA; LINCOPAN, 2012).

As doenças mais frequentes e associadas as ESBLs são as infecções urinárias, pneumonias, septicemias, bacteremias e meningites, entre outras inúmeras infecções (BOCCIA et al., 2001; ZAR; COTTON, 2002). Diante da quantidade de espécies produtoras de ESBLs, tem - se como os principais grupos, a *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus sp*, *Providencia sp* e *Enterobacter sp* (FREITAS et al., 2003; VALVERDE et al., 2004).

Diante dessas informações, produtos naturais tem demonstrado uma grande eficiência nas infecções bacterianas, aonde só justifica a grande variedade de drogas oriundas desses vegetais, que têm aumentado devido aos benefícios apresentados frente a doenças (FENEBRO, 2011). Nesta perspectiva, cada vez mais pesquisas estão 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).

Dessa forma, os terpenos presentes na composição dos óleos essenciais, apresentam diversas aplicações, sendo por sua vez empregados na indústria, para produção de perfumes e cosméticos, além de apresentar diversas propriedades farmacológicas (EDRIS, 2007).



Terpenos são os principais compostos de óleos essenciais das plantas aromáticas, a exemplo do citral (geranial e neral), que trata-se de um monoterpeno acíclico e aldeído, encontrado em diversas plantas, manifestando diversas atividades biológicas, dentre elas e em especial, a ação antimicrobiana (SADDIQ; KHAYYAT, 2010).

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. Desta forma, o monoterpeno citral é uma molécula promissora para a pesquisa de atividade bacteriostática e bactericida frente às cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antibacteriana do monoterpeneo citral frente as cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL.

### 2.2 Objetivos específicos

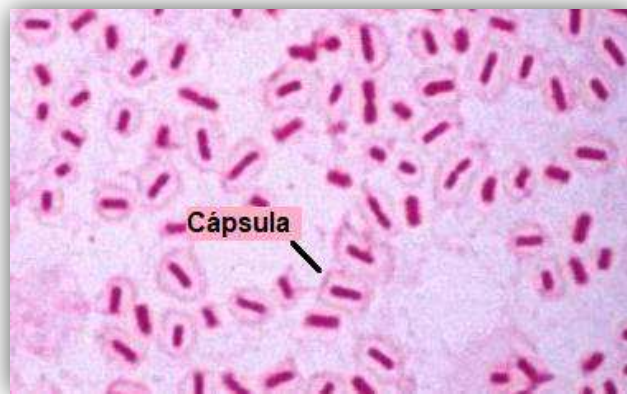
- Investigar a atividade antimicrobiana do citral contra diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do citral.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* faz parte da família Enterobacteriaceae, onde são encontradas em quase todos os habitats naturais como água, solo, plantas e esgotos. Apresentam, até o momento cinco variedades de espécies, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. terrigena* e *K. ornithinolytica*. Em relação ao gênero *K. pneumoniae*, trata-se de uma bactéria contendo bacilos gram-negativos, não móveis e geralmente encapsuladas (figura 1) (MOREIRA; FREIRE, 2014). A referente espécie apresenta bastonete gram-negativo aeróbico facultativo, porém desenvolvem-se melhor em condições aeróbicas, sem esporos e com tamanho que varia de 0,3 a 1 $\mu$  de diâmetro e 0,6 a 6 $\mu$  de comprimento, não apresenta flagelos e suas colônias são grandes e com formato gomoso quando semeadas em placas com nutrientes necessários (UMED, 2002; MARTÍNEZ et al., 2004).

**Figura 1:** Estrutura da *Klebsiella pneumoniae*.



**Fonte:** <https://classconnection.s3.amazonaws.com>.

Quando a *K. pneumoniae* encontra-se cultivada no ágar MacConkey, apresenta colônias de cor rósea, brilhante, de aparência mucoide e tamanho elevado (figura 2). Esse aspecto elevado, corresponde a presença da cápsula polissacarídica (Antígeno K) que têm como função proteger o microrganismo de processos como fagocitoses por granulócitos, contra agente bactericidas, além de contribuir na adesão as células (UMED, 2002; MARTÍNEZ et al., 2004).

**Figura 2:** *K. pneumoniae* cultivada no meio ágar MacConkey.



**Fonte:** [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9e/Klebsiella\\_pneumoniae.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9e/Klebsiella_pneumoniae.jpg).

Além disso, a *K. pneumoniae* apresenta como provas bioquímicas: reação de oxidase negativa, glicose em fermentação, redução na presença de nitrato, lisina positiva, ornitina negativa, transformações química da lactose, tríplice açúcar ferro (TSI) positivo com presença de gás, citrato e indol negativos, uso de citrato como fonte de gás carbônico, além da quebra da uréia, com presença ou ausência de gás, onde essas provas permitem a melhor identificação da espécie (KONEMAN; ALLEN; JANDA, 2001).

Normalmente as infecções em seres humanos por essa bactéria ocorrem devido o contato com as diferentes fontes de ambientes, dessa forma podem ser encontradas colonizando a orofaringe e as fezes de pessoas sadias (MOREIRA; FREIRE, 2014).

Entretanto, os locais mais comuns de infecção, são os tratos urinários 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 encontram com seu sistema imunológico debilitado, assim sendo um fator favorável no desenvolvimento de doenças (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; CERQUEIRA et al., 2011).

### **3.1.1 Tratamento utilizado para *K. pneumoniae***

A literatura mostra que os principais procedimentos para a terapêutica frente a evitar ou eliminar a *K. pneumoniae*, além de seus mecanismos de resistência, estão identificadas, como: Executar a sanitização, a desinfecção e isolar os doentes afetados com o microrganismo, bem como as medidas curativas (SCARPATE; COSSATIS, 2009).

Desta forma, as medidas terapêuticas para tratar pacientes infectados pela *K. pneumoniae*, pode ser divididas em: Terapia empírica e terapia pós a determinação do perfil

de sensibilidade. Em relação a terapia empírica para as infecções causadas pelas enterobactérias multirresistentes constitui no uso de polimixina B ou polimixina E (colistina) associados em um ou mais dos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos (gentamicina ou ampicacina), carbapenêmicos (meropenem ou doripenem) ou tigeciclina (ROSA, 2014).

No caso da terapia pós a liberação do perfil de sensibilidade deve conciliar a utilização dos fármacos. Manter no máximo, sempre que permitido dois medicamentos comprovados sensíveis *in vitro*. Assim, não ocorrendo sensibilidade a um segundo fármaco (susceptível apenas à polimixina B ou E), além de que é recomendado manter o tratamento associado de polimixina B ou E com os carbapenêmicos (meropenem ou doripenem) ou tigeciclina, como forma de tentativa de ocorrer sinergismo entre elas (ROSA, 2014).

### 3.2 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana trata-se dos mecanismos que os microrganismos (bactérias, fungos, parasitas e vírus) desenvolvem a um determinado medicamento antimicrobiano ao qual eram previamente sensíveis. Dessa forma, os mecanismos de resistência que uma ampla variedade de microrganismos infecciosos tem produzido, acarretou em uma ameaça progressiva no âmbito da saúde pública, principalmente pela proliferação desenfreada de muitas bactérias multirresistentes que causam infecções comuns apresentam frente as alternativas de tratamento existentes (WHO, 2015).

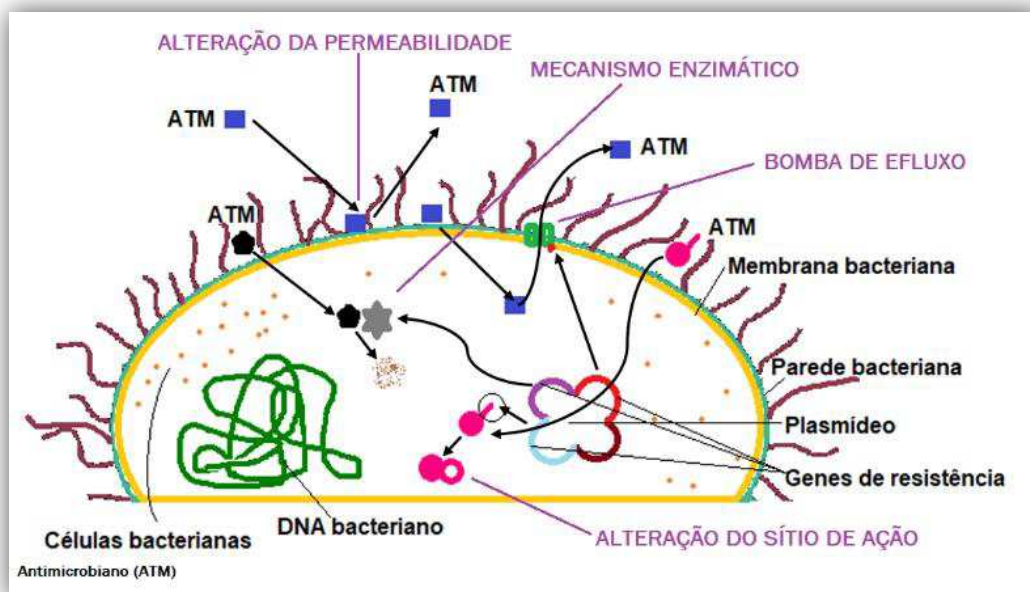
Contudo, diversos fatores encontram-se envolvidos na disseminação desses patógenos resistentes, onde está incluso o uso irracional de antimicrobianos, procedimentos invasivos (cirurgias, implantação de próteses médicas e outros), além da transferência dos genes que contém as informações de resistências aos antibióticos entre as bactérias (ENDIMIAMI et al., 2009; DIENSTMANN et al., 2010; FONTANA et al., 2010).

O microrganismo pode ter resistência natural, quando os genes de resistência fazem parte do seu código genético ou adquirida, quando os genes de resistência são originados de mutações que ocorrem no microrganismo durante seus processos reprodutivo e que resultam de erros de cópia na sequência de bases que formam o DNA (BOSCARIOL, 2013; SOUZA, 2014).

Existem vários mecanismos de resistência às drogas, dentre eles destacam-se: a produção de enzimas betalactamases tipo AmpC, betalactamase de espectro estendido (ESBL) e de carbapenemases, como a metalo-betalactamase e carbapenemases tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), que inativa diversos medicamentos. Outros mecanismos de

defesa, que os microrganismos podem adquirir resistência, são: a diminuição da expressão de porinas na membrana externa; bombas de efluxo que reduzem a concentração intracelular das drogas, além das alterações nos sítios ativos de ligação do fármaco (figura 3) (COELHO et al., 2015).

**Figura 3:** Mecanismo de resistência bacteriana a alguns antimicrobianos.



Fonte: Autor.

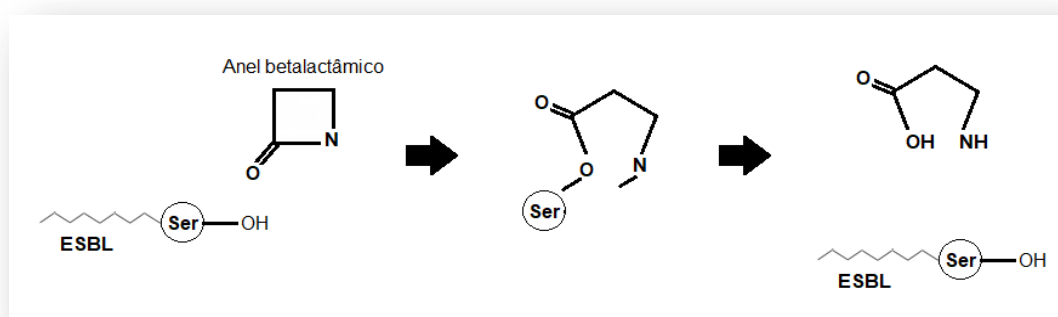
### 3.2.1 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)

Diante dos diferentes tipos de betalactamases que existem, estão dentre elas as denominadas betalactamases de espectro estendido (ESBL), que são originadas a partir de mecanismos de mutações em genes plasmidiais e, que apresentam grande relevância na clínica e nos estudos de epidemias (MARTINS; PICOLI, 2011).

O local onde o gene plasmidial de resistência apresenta-se facilita a sua propagação entre os gram-negativos, principalmente entre as enterobactérias, através de processos como o de conjugação. Muitas vezes os plasmídeos já possuem genes que atribuem resistência a diversas classes de fármacos como as quinolonas e os aminoglicosídeos, assim facilita com que isolados de cepas produtoras de ESBL, principalmente em ambientes hospitalares, sejam multirresistentes, e dificultem o tratamento (LAGO; FUENTEFRIA, S.R.; FUENTEFRIA, D. B., 2010; SÁ, 2010; MARTINS, 2012).

As ESBLs são enzimas produzidas por bactérias a qual promove a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico de cefalosporinas (figura 4), mais precisamente as de terceira geração, e monobactâmicos, sem afetar as cefamicinas e os carbapenens (CDC, 2010). A *K. pneumoniae* juntamente com a *E. coli* são os principais grupos produtores desta enzima (CASSETTARI et al., 2006) sendo os pacientes, profissionais da área de saúde e o meio ambiente os principais veículos de transmissão, apresentando como reservatório principal o trato intestinal (HOSOGLU et al., 2007).

**Figura 4:** Representação do mecanismo de hidrólise de antibióticos.



Fonte: Autor.

Além disso, a produção de ESBL também está associada à resistência a outros antibióticos em microrganismos multirresistentes (BUSH, 2001), apesar de que o uso de testes de triagem em laboratórios para produtores de ESBL pode evitar a utilização de antibióticos betalactâmicos em terapias de sepse, desta forma, prevenindo quadros incontroláveis de infecção hospitalar (TRAGANTE et al., 2008).

Por fim, compreender e conhecer o comportamento das enterobactérias produtoras de betalactamases, é fundamental, principalmente no âmbito hospitalar. Como também a não identificação de cepas no laboratório de microbiologia, pode acarretar no uso inadequado de antibióticos e resultar em falhas nas ações dirigidas para controle de infecções direcionadas à serviços na área da saúde, dessa maneira, contribui ainda mais na disseminação de microrganismos resistentes (MARTINS; PICOLI, 2011).

### 3.3 Epidemiologia das infecções hospitalares causadas por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL

As enterobactérias são microrganismos encontrados normalmente na microbiota humana, porém estes agentes etiológicos podem estar associados a diferentes tipos de infecção, que conseqüentemente resultam índices significativos de morbidade e mortalidade, especialmente no âmbito hospitalar (INGRAHAM; INGRAHAM, 2011; SOARES, 2013).

Diante dessa circunstância esse grupo de bactérias compreende cerca de 30-35% dos isolados que causam septicemias e mais de 70% das infecções urinárias, além de infecções intestinais e extra intestinais como pneumonias, septicemias neonatais, entre outras doenças envolvidas (REIS et al., 2013; SARMENTO, 2013). As bactérias produtoras de ESBL estão entre os principais problemas relacionados a resistência microbiana no setor hospitalar brasileiro. Essas, atualmente compreendem o maior grupo estudado no mundo e têm se tornado motivo de buscas extensivas em investigações microbiológicas, genéticas, bioquímicas e epidemiológicas (PEREIRA et al., 2003).

Nesse contexto, a *K. pneumoniae* representa uma das grandes causadoras de infecções hospitalares, em que segundo a Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana, de acordo com os dados baseados entre os anos de 2006 e 2008, encontrou a *K. pneumoniae* como o segundo microrganismo mais resistente em vários hospitais brasileiros, apontando 13% de casos notificados (DIENSTMANN et al., 2010; CALISTO et al., 2012; SOARES, 2012).

Entretanto, no ano de 2015, o número que compreendia o total de estirpes produtoras de ESBL quando comparado a 2011, havia triplicado, o que representou um aumento de 4,5 %, em relação aos relatos encontrados na literatura. Assim, pode-se destacar um crescimento no valor de isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, em que subiu de 9,6 % em 2011 para 25,9 % no ano de 2015, apresentando diante desses dados um aumento de 16,3 % (MONIZ et al., 2016).

Em relação ao tratamento dessas infecções causadas por enterobactérias, se usa geralmente antimicrobianos da classe dos betalactâmicos, onde trata-se de fármacos de primeira escolha, por apresentarem eficácia terapêutica e baixa toxicidade (GRALHA, 2011). Porém, o uso indiscriminado e exagerado dessas drogas, acarreta no aparecimento de microrganismos, que apresenta inúmeros mecanismos de resistência frente a classe desses medicamentos (MATHEE, 2010; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011; KONG; SCHENEPER; MARTINS; PICOLI, 2011).

Segundo Viana et al. (2011), essa variedade de mecanismos de resistência que as bactérias tendem a promover, é resultado da forma como as comunidades médicas fazem uso dos antimicrobianos. Sendo assim, caracterizar a incidência dessas bactérias e o seu perfil de



resistência, torna-se a base para uma antibioticoterapia ser bem dirigida e estabelecida de forma adequada (RIGATTI, 2010).

Diante da quantidade de surtos hospitalares ocasionadas pela *K. pneumoniae*, esse microrganismo tornou-se uma importante causa de infecções, pelas variadas alterações do seu padrão de sensibilidade frente aos antimicrobianos, onde proporciona o surgimento de mecanismos de resistência bacteriana cada vez mais persistentes (OLIVEIRA; STRANIERI, 2011).

### **3.4 Produtos naturais**

Os produtos naturais tem apresentado uma grande importância quando utilizados no controle da dor, tratamento de doenças, e no combate as infecções bacterianas, sendo seu uso bastante reconhecido pela ciência contemporânea, de forma que uma grande variedade de medicamentos usados atualmente na terapêutica apresentam em sua composição como fonte primária a presença de produtos naturais, extraídos de diversas plantas medicinais (PETROVSKA, 2012).

Estudos relacionados aos metabólitos secundários tem tornado significativo na área da saúde, devido a procura mundial, por substâncias com potencial menos tóxico e de grande eficácia frente aos mecanismos de resistência bacteriana e com capacidade de inibir possíveis patógenos (BARBOSA-FILHO et al., 2007; OSTROSKY et al., 2008).

Segundo Melo et al. (2011), as atividades farmacológicas desses produtos naturais estão cada vez mais sendo pesquisadas, sendo seus desafios: extrair, identificar e aplicar no âmbito industrial farmacêutico esses agentes bioativos, substituindo as substâncias sintéticos. Porém, mesmo com a grande quantidade de trabalhos publicados, o conhecimento é pouco sobre a utilização de plantas com potencial terapêutico para a produção de futuros fármacos (RATES, 2001; MAHESH; SATISH, 2008).

#### **3.4.1 Óleos essenciais**

Os óleos essenciais são um grupo de substâncias naturais voláteis com um variável poder aromatizante, onde sua composição é mais ou menos complexa, que faz parte do organismo de uma gama de espécies vegetais, das quais são extraídos através de técnicas específicas (BAKKALI et al., 2008). De uma forma geral, esses compostos são uma mistura

de substâncias voláteis, lipofílicas, apresentando-se geralmente odoríferas e líquidas (DE LA ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZALEZ-AGUILAR, 2010).

Esses óleos são originados a partir do metabolismo secundário das plantas, sendo formado através de uma mistura de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e derivados oxigenados, como: álcoois, aldeídos, ester, éteres, cetonas, fenóis e óxidos. Contudo, outros compostos voláteis apresentam fenilpropanoide e substâncias que contém em sua constituição elementos como enxofre (P) e ou nitrogênio (N) (BAJPAI et al., 2008).

Em relação as propriedades terapêuticas dos óleos essenciais, vários estudos relatam a eficácia de algumas atividades, destacando as seguintes: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relaxante, anti-séptica das vias respiratórias, larvicida, vermífugas e anti-inflamatórias (HALCON; MILKUS, 2004; COSTA et al., 2005; OYEDJI; AFOLAYAN, 2006; LIMA et al., 2006).

### 3.4.2 Terpenos

Os terpenos também podem ser chamados de terpenoides ou isoprenoides, sendo destacados, devido ser uma classe com maior número de produtos naturais, em que apresentam mais de 55.000 substâncias relatadas (CHANG et al., 2010). Estes compostos terpenoides têm sua origem biossintética a partir das unidades de isopreno, onde através da via do ácido mevalônico é originado (SPITZER, 2004).

Entretanto, compostos terpênicos são classificados de acordo com o número de carbono (C) em suas moléculas, em: Isoprenos ou hemiterpenos (5 C), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C); diterpenos (20 C); sesterpenos (25 C); triterpenos (30 C); tetraterpenos (40 C) e polisoprenoides (C<sub>n</sub>) (quadro 1) (SPITZER, 2004; BAKKALI et al., 2008).

**Quadro 1:** Compostos terpenoides.

Nº de Isopreno	Nº de carbono	Fórmula molecular geral	Nome ou classe
1	5		Isopreno
2	10		Monoterpenóides
3	15		Sesquiterpenóides
4	20		Diterpenóides
5	25		Sesterpenos
6	30		Triterpenóides
8	40		Tetraterpenóides
n	N	(C <sub>n</sub> H <sub>8</sub> ) <sub>n</sub>	Polisoprenóides

**Fonte:** Autor.

Uma ampla variedade desses compostos pertencentes a essa classe de metabólitos secundários são empregados para fins comerciais como forma de aromatizantes, fragrâncias e especiarias, além de suas utilidades no ramo dos produtos de perfumaria e cosméticos, como também na indústria de alimentos. Já, no setor farmacêutico além do uso desses compostos como excipientes no tratamento de pele (melhorando assim a penetração do produto), eles são indicados também como ativos de medicamentos (PADUCH et al., 2007).

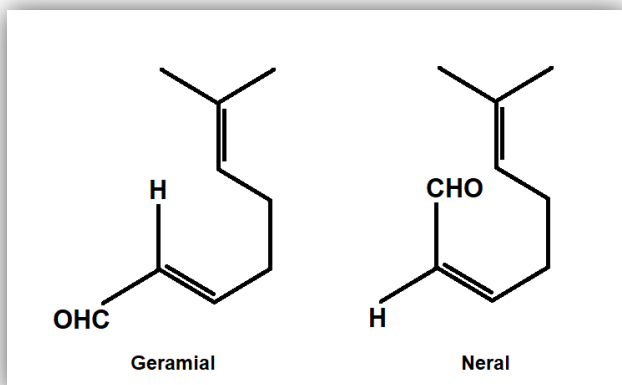
A procura e o interesse crescente por essas substâncias na clínica, é resultante devido à gama de propriedades terapêuticas que os terpenos tem demonstrado em estudos, como efeitos antitumoral, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, anti-hiperglicêmico, analgésico, anti-inflamatório, além de atividades antiparasitárias (PADUCH et al., 2007).

### **3.4.3 Citral**

Várias pesquisas foram realizadas com fitoconstituintes oriundos de plantas medicinais, que apresentam um alto valor terapêutico com o intuito de encontrar fontes que possam ser usadas para a produção de novos fármacos, desta forma, contribuindo na terapêutica de diversas doenças. A ampla diversidade desses compostos encontrados em tais produtos naturais é que resulta na variedades de propriedades farmacológicas que esses produtos tem demonstrado (ARESI, 2011).

O fitoconstituente citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) trata-se de um aldeído alifático de origem natural classificado como monoterpeneo, em que é formado pela união de unidades de isopreno (geranial e neral) (figura 5). Esse fitoconstituente é um composto chave de bastante importância presente nos óleos essenciais extraído de diversas plantas, como: a erva-limão (*Cymbopogon citratus*) (figura 6), Melissa (*Melissa officinalis*) e a verbena (*Verbena officinalis*) (NAKAMURA et al., 2003). Onde segundo Andrade et al. (2009), na análise de diversos óleos, nas mais variadas regiões identificou o citral, como o principal composto.

**Figura 5:** Estrutura química dos isômeros do citral.



**Fonte:** Autor.

**Figura 6:** *Cymbopogon citratus*.



**Fonte:** <https://c2.staticflickr.com>.

O monoterpeneo citral é de grande utilidade na indústria de alimentos e cosméticos, servindo respectivamente, como aditivo alimentar e para produção de fragrância (NAKAMURA et al., 2003; DUDAI et al., 2005). Estudos realizados com o citral, indicam o fitoconstituente como um composto de baixa toxicidade e potencial carcinogênico em ratos (NAKAMURA et al., 2003; DUDAI et al., 2005), além de relatos da ausência de efeitos carcinogênicos *in vitro* quando o citral fora testado (LERTSATITTHANAKORN et al., 2006).

Embora o citral seja um componente de óleo essencial que apresenta diversos estudos, seus principais fatores que dificultam a resistência microbiana, mecanismo de ação antimicrobiano e a base biológica em relação a resistência não são inteiramente elucidados. Em geral, sabe-se que o principal local de ação tóxica de terpenos é a membrana plasmática, porém em relação aos mecanismos finais de inibição de crescimento, lesão celular e inativação não encontram-se completamente definidos (PRASHAR et al., 2003; LUO et al., 2004; PARK et al., 2009).

Esse monoterpeneo apresenta propriedades farmacológicas conhecidas, como: anti-tumoral (DUDAI et al., 2005; CHAOUKI et al., 2009; FARAH et al., 2010; XIA et al., 2013), broncodilatador (MANGPRAYOOL, KUPITTAYANANT, CHUDAPONGSE, 2013), inseticida (ABRAMSON, ALDAMA, SULBARAN, 2007) e antimicrobiana (SOMOLINOS et al., 2010; BELDA-GALBIS et al., 2013). Além dessas, apresentam também efeitos anti-inflamatórios (LEE, 2008). Segundo Belletti et al. (2007), o citral por demonstrar atividade antimicrobiana e é considerado uma molécula bastante promissora.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Local de trabalho

A presente pesquisa foi realizada no laboratório de Microbiologia (J11) no Centro de Educação e Saúde / Universidade Federal de Campina Grande, campus Cuité, no estado da Paraíba.

### 4.2 Cepas bacterianas e meio de cultura

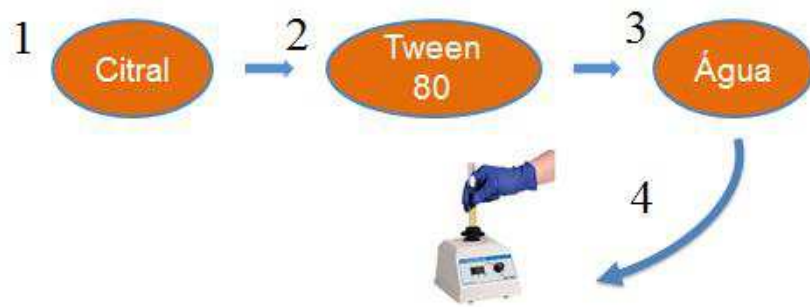
Para a realização do trabalho, foram utilizadas cepas bacterianas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL (A-363, A-368, 73, 23, C-46 e LJ-09), sendo estas de origem clínica isoladas de urina e secreções orofaríngeas, a qual foram doadas pela farmacêutica Bernadete Helena Cavalcanti dos Santos (Laboratório de Microbiologia Clínica/DCF/Universidade Federal da Paraíba) e estocadas em meio sólido Muller Hinton.

Os meios de culturas utilizados foram o caldo Brain Heart Infusion (Sigma-Aldrich) e o sólido Muller Hinton. O preparo destes meios seguiu as instruções do fabricante e foram distribuídos em tubos e placas de ensaio ideais para os estudos microbiológicos. As cepas bacterianas foram repicadas no meio de cultura Muller Hinton, incubadas em estufa bacteriológica durante 24 horas a uma temperatura de 37°C.

### 4.3 Citral

A substância citral foi obtida comercialmente pela Sigma-Aldrich®. Para o preparo utilizou o Polissorbato 80 (Tween 80) 1%, na solubilização do monoterpene (citral) para diluir em água (figura 7). Todas as substâncias relatadas foram adquiridas comercialmente e se encontra no local de pesquisa.

**Figura 7:** Preparo da emulsão contendo o fitoconstituente. Realizou-se a solubilização do Citral (1) no Tween 80 (2), posteriormente foi feita a adição de água destilada (3) aos poucos e, por final agitou a solução em vórtex (4) para garantir a homogeneidade da emulsão.



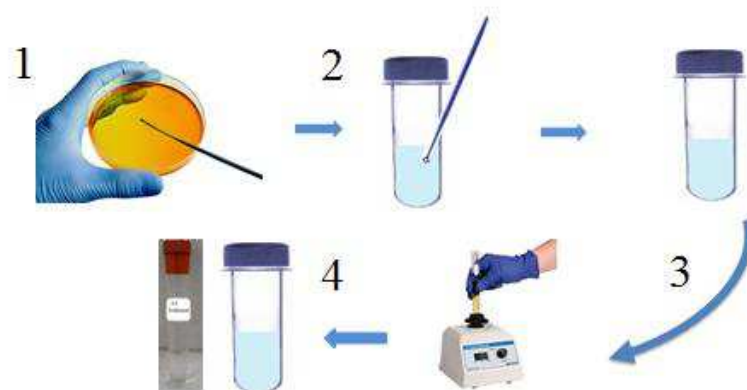
Fonte: Autor

#### 4.4 Inóculo

Para o preparo do inóculo, foi retirada uma alíquota da cepa de *K. pneumoniae* previamente semeado em Muller Hinton e suspendeu-a em tubo com solução salina a uma concentração de 0,85% estéril (figura 8).

O inóculo foi ajustado de acordo com a escala de 0,5 McFarland em suspensão do microrganismo em solução salina 0,85% estéril, diluído até atingir a concentração correspondente a  $0,5 \times 10^8$  UFC/ mL<sup>-1</sup>.

**Figura 8:** Preparo do inóculo. Retirou-se uma pequena alíquota da cepa de *K. pneumoniae* (1), suspendeu-a em um tubo de ensaio contendo solução salina (2), posteriormente foi feita a agitação da suspensão com auxílio do vórtex (3), e por final realizou-se a comparação com o padrão a 0,5 McFarland ( $0,5 \times 10^8$  UFC/ m<sup>-1</sup>).



Fonte: Autor.

#### 4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da CIM do fitoconstituente selecionado citral, foi realizada a 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, obteve-se as concentrações de 1024 a 1 µg/mL, efetuadas na própria placa, da coluna 1 até a 11. A última coluna (12) ficou reservada para o controle de crescimento do microrganismo para poder observar a viabilidade da cepa (caldo Brain Heart Infusion juntamente com o inóculo, sem o produto testado). Também foi realizado o controle de esterilidade (caldo), além da toxicidade do veículo (tween, inóculo e o caldo) (CLSI, 2005; SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007; HUSSAIN et al., 2011).

Em seguida, foi adicionado 10 µL do inóculo (bactéria a 0,5 McFarland) em cada uma das cavidades. O ensaio foi realizado em triplicata, e as placas foram incubadas a  $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  no período de 24 horas para *K. pneumoniae*. Após o tempo de incubação adequado, 20 µL resazurina a 1% (SIGMA), que se trata de um indicador colorimétrico de óxido-redução para bactérias, foi adicionado e em seguida procedeu visualmente a leitura, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo através da observação da mudança da coloração da solução de azul para rosa/vermelho. 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).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os constantes aumentos de meios de resistência que as bactérias tem 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, 2009).

Desta forma, muitas pesquisas tem focado a investigação de produtos naturais como fonte de novos compostos bioativos uma vez que tem sido relatada o aumento da resistência contra antimicrobianos durante o tratamento das doenças infecciosas. Assim, estudos tem mostrado atividade antimicrobiana dos produtos naturais, bem como a capacidade desses agentes em modular a ação dos antimicrobianos, com aumento ou diminuição dos seus efeitos (COUTINHO et al., 2008; VERAS et al., 2013).

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, observado a partir da leitura da placa, visualmente, e verificou a presença do crescimento bacteriano através da mudança do aspecto límpido para turvo, e confirmou o crescimento por meio de um indicador colorimétrico, a resazurina. Dessa forma, a *Klebsiella pneumoniae* demonstrou resistência frente ao citral nas concentrações testadas.

**Tabela 1:** Concentração Inibitória Mínima (CIM em µg/mL) do citral contra cepas de *K. pneumoniae*.

	<i>K. pneumoniae</i> A-363	<i>K. pneumoniae</i> A-368	<i>K. pneumoniae</i> 73	<i>K. pneumoniae</i> 23	<i>K. pneumoniae</i> C – 46	<i>K. pneumoniae</i> LJ-09
2048 µg/mL	+	+	+	+	+	+
1024 µg/mL	+	+	+	+	+	+
512 µg/mL	+	+	+	+	+	+
256 µg/mL	+	+	+	+	+	+
128 µg/mL	+	+	+	+	+	+
64 µg/mL	+	+	+	+	+	+
32 µg/mL	+	+	+	+	+	+



+: Crescimento bacteriano visível.

Pinto et al. (2003) relata que o método de diluição em caldo irá considerar e analisar a relação entre a proporção que o microrganismo testado cresce no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. O teste será comparado a um padrão biológico de referência. Logo, a densidade da turbidez provocada pelo o crescimento do microrganismo, é o que entende-se de proporção.

No estudo de Santos et al. (2009) o citral quando testado 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 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, onde essa atividade é comprovada através dos valores da CIM apresentados no estudo, em que corresponde a: alta inibição (0,08 mg/mL) para a *S. aureus* enquanto que para a *P. aeruginosa* e a *E. coli* apresentou baixa atividade antimicrobiana (1,25 mg/mL e 0,63 mg/mL), respectivamente.

Essas concentrações inibitória mínima (CIM) do fitoconstituente frente a esses microrganismos é muito próxima quando comparada com outros estudos, onde alguns autores ao estudar a atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais contra vários microrganismos, preconizaram valores que tem se apresentado como referência, e seguem a seguinte interpretação: CIM até 0,5 mg/mL – inibição alta; CIM entre 0,6 e 1,55 mg/mL – inibição moderada e CIM acima de 1,65 mg/mL – inibição baixa, em que estes valores serviram como referência para a atividade do citral frente a estas cinco espécies mencionadas (SANTOS et al., 2009).

De acordo com Naik et al. (2010) o óleo de capim limão (*Cymbopogon citratus*) do qual o citral é extraído, foi eficaz frente aos organismos como *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, exceto com a *P. aeruginosa*. Entretanto, os microrganismo gram-positivos (*S. aureus*, *B. cereus* e *B. subtilis*) apresentaram-se mais sensíveis do que os microrganismos gram-negativos (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*). Nesse estudo, observa que o óleo essencial apresentou atividade frente a *K. pneumoniae*, não corroborando com o trabalho realizado, porém deve-se levar em consideração que o autor utilizou o óleo e não a substância isolada (citral), assim o fitoconstituente em estudo, juntamente com outros a qual a espécie vegetal apresenta, potencializaram em conjunto a atividade antibacteriana do óleo.

Millezi et al. (2012) diz que os óleos essenciais trata-se de compostos que, por apresentarem característica hidrofóbica, possuem uma facilidade maior de se difundir pela parede celular dos microrganismos e assim causar prejuízos à membrana, especialmente na sua fluidez e permeabilidade.

Desta forma, esses óleos essenciais inclusive o de capim limão (*Cymbopogon citratus*), apresenta maior atividade frente a bactérias gram-positivas, enquanto que frente as gram-negativas são mais resistentes, já que as mesmas possuem uma maior complexidade na sua membrana plasmática (NAIK et al., 2010). Neste caso, seria uma justificativa sobre a resistência que a *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL apresentou no presente estudo ao monoterpeno citral.

Em outro estudo realizado, comprovou-se a atividade bacteriostática e bactericida do citral frente a microrganismos como *Listeria monocytogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* (GOLDBECK et al., 2014).

De acordo com De Menezes Caldas et al. (2016), substâncias que apresentam (CIM) até 500 µg/mL são considerados como: Forte poder antimicrobiano; substâncias com CIM entre 600 e 1500 µg/mL: moderado poder antimicrobiano, e substâncias com CIM acima de 1500 µg/mL possuem: fraco poder antimicrobiano. Desta forma, pode-se afirmar que o citral apresentou fraco poder antimicrobiano, devido apresentar crescimento até uma concentração de 2048 µg/mL contra as cepas de *K. pneumoniae*. Porém, é necessário mais estudos adicionais, outras técnicas, ou até mesmo a utilização de cepas padrões, invés de cepas clínicas, para testar esse monoterpeno nessas concentrações, e quem sabe assim ele possa apresentar resultados contra a *K. pneumoniae*.

## 6. CONCLUSÃO

Portanto, através dos experimentos realizados no presente estudo, notou-se que o fitoconstituente citral não inibiu o crescimento das cepas de *Klebsiella pneumoniae*, como não apresentou atividade antibacteriana contra as mesmas nas concentrações e condições testadas.

Dessa forma, devido à importância da contribuição dos óleos essenciais e sua atividade antimicrobiana comprovada em alguns microrganismos, se faz necessário mais estudos exploratórios pela busca de novas alternativas para o combate de bactérias multirresistente, como por exemplo, o sinergismo entre as drogas vegetais e alguns fármacos, potencializando ainda mais seus efeitos antibacterianos.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, C. H.; ALDAMA, E.; SULBARAN, E. Exposure to citral, cinnamon and ruda disrupts the life cycle of a vector of Chagas disease. **American Journal of Environmental Sciences**, v. 3, p. 7 – 8, 2007.
- ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. D. G. B.; LIMA, M. D. P. Chemical composition of the essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf cultivated in North of Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 12, n. 1, p. 41-45, 2009.
- ARESI, C. **Avaliação da potencial atividade antimicrobiana de produtos de origem natural: estudo bioguiado de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub.** 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2011.
- BAJPAI, V.K.; RAHMAN, A.; SUN C.K. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, n.2, p.117-22, 2008.
- 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.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; NASCIMENTO-JÚNIOR, F. A. D.; TOMAZ, A. C. D. A.; ATHAYDE-FILHO, P. F. D.; SILVA, M. S. D.; CUNHA, E. V. L.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 141-148, 2007.
- BELDA-GALBIS, C. M.; PINA-PÉREZ, M. C.; LEUFVÉN, A.; MARTÍNEZ, A.; RODRIGO, D. Impact assessment of carvacrol and citral effect on *Escherichia coli* K12 and *Listeria innocua* growth. **Food control**, v. 33, n. 2, p. 536-544, 2013.
- BELLETTI, N., KAMDEM, S. S., PATRIGNANI, F., LANCIOTTI, R., COVELLI, A., & GARDINI, F. Antimicrobial activity of aroma compounds against *Saccharomyces cerevisiae* and improvement of microbiological stability of soft drinks as assessed by logistic regression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 17, p. 5580-5586, 2007.
- BOCCIA, D.; STOLFI, I.; LANA, S.; MORO, M. L. Nosocomial necrotizing enterocolitis outbreaks: epidemiology and control measures. **European Journal of Pediatrics**, v. 160, n. 6, p. 385-391, 2001.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman.** 12 ° ed. Porto Alegre: AMGH, 2011.
- BOSCARIOL, R. **Resistência bacteriana: Avaliação do conhecimento farmacêutico no estado de São Paulo.** 2013. 96 F. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica), Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2013.

BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, n.7, p.1085-1089, 2001.

CALISTO, F.; CANDEIAS, C.; CERQUEIRA, S. S.; LITO, L.; MELO-CRISTINO, J.; DUARTE, A. Carbapenemase KPC-3 em estirpes de *Klebsiella pneumoniae* numa unidade hospitalar. **RPDI-Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas**, v. 8, n. 3, 2012.

CASSETTARI, V. C.; SILVEIRA, I. R.; BALSAMO, A. C.; FRANCO, F. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit linked to onychomycosis in a health care worker. **Jornal Pediatria**, v. 82, n. 4, p. 313-316, 2006.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Laboratory Detection of Extended – Spectrum B-Lactamases (ESBL)**. 2010. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/HAI/settings/lab/lab\\_esbl.html](http://www.cdc.gov/HAI/settings/lab/lab_esbl.html)>. Acesso em: 13 de Junho de 2017.

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.

CHANG, T. H.; HSIEH, F. L.; KO, T. P.; TENG, K. H.; LIANG, P. H.; WANG, A. H. J. Structure of a Heterotetrameric Geranyl Pyrophosphate Synthase from Mint (*Mentha piperita*) Reveals Intersubunit Regulation. **The Plant Cell Online**, v. 22, n. 2, p. 454–467, 2010.

CHAOUKI, W.; LEGER, D. Y.; LIAGRE, B.; BENEYTOU, J. L.; HMAMOUCHE, M. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, n. 5, p. 549-556, 2009.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos para Bactérias de Crescimento Aeróbio: Norma Aprovada**, method M7-A6, 6ª ed. Wayne Ed.; v. 23, n. 2, 2005.

COELHO, I. C.; DA SILVA, F. L.; NUNES, M. D. R. C. M.; LOPES, L. S.; CARNEIRO, L. P.; FERREIRA, P. H. P. B. Avaliação da suscetibilidade da *Klebsiella pneumoniae* aos betalactâmicos. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 5, n. 2, p. 79-83, 2015.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 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.

DE LA ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability**. 1ª ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010.

DE MENEZES CALDAS, C. P.; DE SOUSA, J. P.; DE LIMA PÉREZ, A. L. A.; DOS SANTOS, J. M. C. G.; DE OLIVEIRA, H. M. B. F.; DE OLIVEIRA FILHO, A. A.; EDELTRUDES DE OLIVEIRA, L. I. M. A. Atividade antifúngica in silico e in vitro do monoterpeno citral. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 905-912, 2016.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-7, 2010.

DUDAI, N.; WEINSTEIN, Y.; KRUP, M.; RABINSKI, T.; OFIR, R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. **Planta medica**, v. 71, n. 05, p. 484-488, 2005.

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.

ENDIMIANI, A.; JOHN, M. D.; SANDRA, F.; FEDERICO, P.; ANDREA, M. H.; DANESHIA, R. P.; PAUL, D. F.; NANCY, P.; BRANDON, K.; AIDA, E. C. C.; FRED, C. T.; ROBERT, A. B. Emergence of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 5, p. 1102-1110, 2009.

FARAH, I. O.; TRIMBLE, Q.; NDEBELE, K.; MAWSON, A. Retinoids and citral modulated cell viability, metabolic stability, cell cycle progression and distribution in the A549 lung carcinoma cell line. **Biomedical Science Instrumentation**, v. 46, p. 410-421, 2010.

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

FONTANA, C.; FAVARO, M.; SARMATI, L.; NATOLI, S.; ALTIERI, A.; BOSSA, C. M.; MINELLI, S.; LEONARDIS, F.; FAVALLI, C. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 1, p. 40, 2010.

FREITAS, A. L. P. D.; MACHADO, D. P.; SOARES, F. D. S. C.; BARTH, A. L. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella spp* and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian Teaching Hospital: Detections, Prevalence and Molecular Typing. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 344-348, 2003.

GRALHA, R. E. F. **Métodos de pesquisa de betalactamases em amostras clínicas – estudo de revisão**. 2011. 69 f. Tese (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2011.

GOLDBECK, J. C.; VICTORIA, F. N.; MOTTA, A.; SAVEGNAGO, L.; JACOB, R. G.; PERIN, G.; LENARDAO, E. J.; PADILHA DA SILVA, W. Bioactivity and morphological changes of bacterial cells after exposure to 3-(p-chlorophenyl)thio citronellal. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 813-819, 2014.

- GUPTA, A.; AMPOFO, K.; RUBENSTEIN, D.; SAIMAN, L. Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature. **Journal of Perinatolog**, v. 23, P. 439–443, 2003.
- HALCON, L.; MILKUS K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**, v. 32, n. 7, p. 402-408, 2004.
- HO, P. L.; SHEK, R. H.; CHOW, K. H.; LAI, W. M. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases among bloodstream isolates of *Enterobacter spp.* In Hong Kong, 2000-2002. **Journal Antimicrobial Chemother**, v. 55, p.326–332, 2005.
- HONÓRIO, L. C.; SANTOS, I. B.; ASSIS, A. M. L.; SANTOS FILHO, L. Análise do perfil de resistência de enterobactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL) isoladas em João Pessoa, PB. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 33, n. 4, p. 179-182, 2001.
- HOSOGLU, S.; GUNDES, S.; KOLAYLI, F.; KARADENIZLI, A.; DEMIRDAG, K.; GUNAYDIN, M.; ALTINDIS, M.; CAYLAN, R.; UCMAK, H. Extended-spectrum beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkish hospitals. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 346, 2007.
- HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; SARKER, S. D.; MOORE, J. E. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as na indicator of cell growth. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1199-1206, 2011.
- INGRAHAM, J. L.; INGRAHAM, C. A. **Introdução à microbiologia**: uma abordagem baseada em estudos de casos. 3<sup>o</sup> ed. São Paulo: Cengage, 2011.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico–Texto e Atlas Colorido**. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.
- KONG, K. F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. **Apmis**, v. 118, n. 1, p. 1-36, 2010.
- LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430-444, 2010.
- LEE, H. J.; JEONG, H. S.; KIM, D. J.; NOH, Y. H.; YUK, D. Y.; HONG, J. T. Inhibitory effect of citral on no production by suppression of inos expression and NF- $\kappa$ B activation in RAW264. 7 cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 3, p. 342-349, 2008.
- LERTSATITTHANAKORN, P.; TAWEECHAI SUPAPONG, S.; AROMDEE, C.; KHUNKITTI, W. In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. **International Journal of Aromatherapy**, v. 16, n. 1, p. 43-49, 2006.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LUO, M., JIANG, L. K., HUANG, Y. X., XIAO, M., LI, B., ZOU, G. L., & ZHANG, Y. S. Effects of citral on *Aspergillus flavus* spores by quasi-elastic light scattering and multiplex microanalysis techniques. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 36, n. 4, p. 277-283, 2004.

MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, n. 5, p. 839-843, 2008.

MANGPRAYOOL, T.; KUPITTAYANANT, S.; CHUDAPONGSE, N. Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. **Fitoterapia**, v. 89, p. 68-73, 2013.

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M.; SILVA, J.; MARTINEZ, R. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 261-8, 2004.

MARTINS, A. C.; PICOLI, S. U. Métodos alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 421-426, 2011.

MARTINS, A. F. M. M. **Prevalência de resistência a antimicrobianos em isolados ambientais de *Escherichia coli* e enterococos**. 2012. 107 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímica em Saúde) - Instituto Politécnico do Porto, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Portugal, 2012.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**. v.41, n.6, p.1088-1093, 2011.

MILLEZI, A.F.; CAIXETA, D.S.; ROSSONI, D.F.; CARDOSO, M.G.; PICCOLI, R.H. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n.1, p. 167-172, 2012.

MONIZ, S. B.; SILVA, A. R.; CORREIA, C.; TORRINHA, A.; PEREIRA, A. M.; AMORIM, J. C. Prevalência de  $\beta$ -Lactamases de espectro estendido (ESBL) e Carbapenemases (KPC) em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* no Laboratório BMAC- Análise retrospectiva de 2011 a 2015. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 5, n. 1, p. 45-51, 2016.

MOREIRA, V. C.; FREIRE, D. ***Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antibióticos**. 2014. Disponível em:

<<https://scholar.google.com.br/scholar?lookup=0&q=Klebsiella+pneumoniae++sua+resist%>



C3%AAnCIA+a+antibi%C3%B3ticos.+&hl=pt-BR&as\_sdt=0,5>. Acesso em: 2 de junho de 2017.

NAKAMURA, Y.; MIYAMOTO, M.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T.; UCHIDA, K. A phase II detoxification enzyme inducer from lemongrass: identification of citral and involvement of electrophilic reaction in the enzyme induction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 302, n. 3, p. 593-600, 2003.

NAIK, M. I.; FOMDA, B. A.; JAYKUMAR, E.; BHAT, J. A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 7, p. 535-538, 2010.

OLIVEIRA, H. C.; STRANIERI, I. **Entenda Mais Sobre a KPC**. Centro de informações sobre medicamentos- HUIJM Hospital Universitário Júlio Muller. 2011. Disponível em: <<http://www.ufmt.br/hujm/arquivos/90a1fa1519ea5fdb695df6978aeec758.pdf>>. Acesso em: 10 de junho de 2017.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OYEDEJI, A. O.; AFOLAYAN, A. J. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil isolated from South African *Mentha longifolia* (L.) L. subsp. capensis (Thunb.) Briq. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, 2006.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.

PARK, M. J.; GWAK, K. S.; YANG, I.; KIM, K. W.; JEUNG, E. B.; CHANG, J. W.; CHOI, I. G. Effect of citral, eugenol, nerolidol and  $\alpha$ -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 5, p. 290-296, 2009.

PEREIRA, A. D. S. CARMO FILHO, J. R. D.; TOGNIM, M. C. B.; SADER, H. S. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. **Jornal Brasileiro de Patologia e medicina Laboratorial**, v. 39, n.4, p. 301-308, 2003.

PETROVSKA, B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; 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). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1762-1770, 1998.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos**. Atheneu, 2003.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. SADDIQ, A.A.; KHAYYAT: an emerging public-health concern. **Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p. 159–166, 2008.

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.

PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 569-575, 2003.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REIS, H. P. L. C.; VIEIRA, J. B. M.; SARTORI, D. P.; FONSECA, D. P.; VIANA, D. B.; CUNHA, J. M. Avaliação da resistência microbiana em hospitais privados de Fortaleza – Ceará. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 1, p. 83-87, 2013.

RIGATTI, F. **Detecção da resistência à oxacilina e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus coagulase negativos* isolados em um hospital escola.** 2010. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, 2010.

ROSA, T. C. R. A. **Análise de aspectos epidemiológicos e clínicos e caracterização de genes de resistência das Enterobactérias produtoras de carbapenemases em um hospital do Distrito Federal.** 2014. 80 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia), Bacharelado em Farmácia, na Universidade de Brasília, Ceilândia, Distrito Federal, 2014.

SÁ, C. M. F. **ESBL em enterobactérias no Centro Hospitalar Póvoa de Varzim/Vila do Conde.** 2010. 128 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade de Aveiro, Portugal, 2010.

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.; PADUAN, R. H.; GAZIN, Z. C.; JACOMASSI, E.; D'OLIVEIRA, P. S.; CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 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.

SARMENTO, L. B. S. **Incidência de infecções hospitalares por enterobactérias em um Hospital de Campina Grande-PB.** 2013. 30 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

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

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

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, 2012.

SOARES, V. M. Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 251-253, 2012.

SOARES, S. F. **Epidemiologia de estirpes produtoras de ESBL em itu**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade de Aveiro, Portugal, 2013.

SOMOLINOS, M.; GARCÍA, D.; CONDÓN, S.; MACKAY, B.; PAGÁN, R. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 1928-1939, 2010.

SOUSA, T. N. **Uroculturas realizadas no LAC/UEPB: Perfil dos pacientes acometidos e estudo do micro-organismo mais frequente**. 2014. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia), Universidade Estadual da Paraíba, Campina, 2014.

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**. 5º ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

TRAGANTE, C. R.; CECCON, M. E. J.; FALCÃO, M. C.; SEITI, M.; SAKITA, N.; VIEIRA, R. A. Prevalência de sepse por bactérias Gram negativas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido em Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 26, n. 1, p. 59-63, 2008.

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.

UMED, O. ***Klebsiella* infections**. Microbiology Gulbarga Univ. 2002. Disponível em: <[http://: medicineinstantaccess.totheminds of medicine](http://medicineinstantaccess.totheminds of medicine)>. Acesso em: 7 de novembro de 2007.

VALVERDE, A.; COQUE, T. M.; SÁNCHEZ-MORENO, M. P.; ROLLÁN, A.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4769-4775, 2004.

VIANA, A. P. P.; APP, S. R.; CASTRO, A. R. L.; KLUCZYNIK, C. E. N.; CATÃO, R. M. R. Incidência Bacteriana em Hemoculturas de Recém-nascidos e perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos. **Revista Brasileira de Biologia e Farmácia, Pernambuco**, v. 5, n. 1, 2011.

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.

XIA, H.; LIANG, W.; SONG, Q.; CHEN, X.; HONG, J. The in vitro study of apoptosis in NB4 cell induced by citral. **Cytotechnology**, v. 65, n. 1, p. 49-57, 2013.

WOLLHEIM, C. **Epidemiologia molecular de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp* produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado**. 2014. 170 F. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 11 de maio de 2017.

ZAR, H. J.; COTTON, M. F. Nosocomial pneumonia in pediatric patients. **Pediatric Drugs**, v. 4, n. 2, p. 73-83, 2002.

**ANEXOS**

## ANEXO A: Resumo do Trabalho Publicado no I Congresso Nacional de Ciências da Saúde.



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

Maria Alana Neres de Pontes<sup>1</sup>

Igara Oliveira Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)-Campus Cuité-PB<sup>1</sup>

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 monoterpênos 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 monoterpêno. 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 monoterpêno 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.

## ANEXO B: Banner do Trabalho no I Congresso Nacional de Ciências da Saúde.

**I CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

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

Maria Alana Neres de Pontes<sup>1</sup>; Igara Oliveira Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)-Campus Cuité-PB  
E-mail: alaninha\_pontes@hotmail.com  
E-mail: igaralima@gmail.com

### INTRODUÇÃO



> ↑ surtos hospitalares por *Klebsiella pneumoniae* → mudança no perfil de sensibilidade → diferentes formas de resistência:

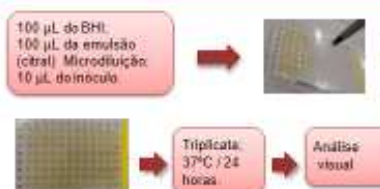
Produção de enzimas capazes de desativar o grupo farmacofórico dos beta lactâmicos, um dos mais importantes

> Busca de substâncias eficientes frente a multiresistência → Estudos com Produtos Naturais, com o Citral, tem sido promissor.

### OBJETIVO

> Estudar a atividade antimicrobiana do monoterpene citral contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

### METODOLOGIA



### RESULTADOS

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

	R produtora 4-88	R produtora 4-88	R produtora 71	R produtora 21	R produtora 1-41	R produtora 1-41
1024 µg/mL	+	+	+	+	+	+
512 µg/mL	+	+	+	+	+	+
256 µg/mL	+	+	+	+	+	+
128 µg/mL	+	+	+	+	+	+
64 µg/mL	+	+	+	+	+	+
32 µg/mL	+	+	+	+	+	+

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

> Através dos experimentos realizados no presente estudo, notou-se que o fitoconstituinte citral não inibiu o crescimento das cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL.

### REFERÊNCIAS

- OLIVEIRA, A. D.; MACHADO, P.; AMARAL, J.; LITO, L.; MELLO-ORLANDO, J.; DUARTE, A. Resistência de *Klebsiella pneumoniae* em doentes de unidades de terapia de suporte de Santa Maria em Lisboa. *Acta Paediatrica*, v. 42, p. 40-43, 2011.
- DOUTY, H. D.; COSTA, J. G. M.; LIMA, G. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. In vitro reference of bioactive elements and phytochemistry in the essential oil of *Leptosiphon*. *Pharmazie*, v. 67, p. 1054-1056, 2012.
- CLB 107-48. Microbiologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos para Escherichia Coliforme Aeróbico. Norma Brasileira - Santa Luzia, Vol. 21, 2005.
- PODCHAL, M.; ULLMANN, R. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens. *Epidemiology, Taxonomy, Typing, Methods, and Pathogenicity Factors*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, p. 58-60, 1998.
- OURIQUET, E. G. S.; COSSATE, J. J. A presença de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β-lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. *Saúde & Ambiente*, v. 4, p. 1-11, 2008.
- VENIG, H. H.; RODRIGUES, F. F. G.; BOTELHO, M. A.; SOUZA, L. S. A.; DOUTY, H. D. M.; COSTA, J. G. M. Enhancement of aminoglycosides and β-lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia alata* Cham. and the Thymal. *Krabas Journal of Chemistry* (2012).

## ANEXO C: Certificado do Trabalho no I Congresso Nacional de Ciências da Saúde.





## ANEXO D: Comprovante e agendamento do trabalho em forma de artigo na Revista Brasileira de Ciências da Saúde.

ID 28085 - Agendamento [RBCS] Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos citral, citronelal e citronelol



Wilton Wilney Nascimento Padilha <editoriasaudeccs@gmail.com>

seg 13/03, 07:12

Você; Dijaci Santos de Lima (dijaci.lima@hotmail.com); Sávio Marcelino Gomes (svgomes77@gmail.com); mais 2 ✕



Responder | ▾

Prezados Autores,  
Finalizamos a fase de adequações.  
O trabalho foi agendado ara publicação no v.22, n.1 de jan/mar de 2018.  
Att.  
Wilton Padilha  
EC

---

Revista Brasileira de Ciências da Saúde  
<http://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/rbcs>