



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTO**



PPgDITM - UFPB/UFRN/UFC/UFRPE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DO S-(-)-LIMONENO ISOLADO E
INCORPORADO A NANOEMULSÃO E NANOEMULGEL SOBRE CEPAS DE
*Klebsiella pneumoniae***

RAVENNA LEITE DA SILVA

JOÃO PESSOA

2024

RAVENNA LEITE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DO S-(-)-LIMONENO ISOLADO E
INCORPORADO A NANOEMULSÃO E NANOEMULGEL SOBRE CEPAS DE
*Klebsiella pneumoniae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba como requisito para a obtenção do título de Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Orientador: Prof^o Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

Coorientador: Prof^o Dr. Elquio Eleamen Oliveira

JOÃO PESSOA

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586a Silva, Ravenna Leite da.

Avaliação do efeito antibacteriano do S-(-)-limoneno isolado e incorporado a nanoemulsão e nanoemulgel sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* / Ravenna Leite da Silva. - João Pessoa, 2024.

81 f. : il.

Orientação: Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Coorientação: Elquio Eleamen Oliveira.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Antimicrobiano. 2. Antibacteriano. 3. *Klebsiella pneumoniae*. 4. nanoemulsão. 5. S-(-)-limoneno. I. Oliveira Filho, Abrahão Alves de. II. Oliveira, Elquio Eleamen. III. Título.

UFPB/BC

CDU 604.4:615.33(043)

RAVENNA LEITE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DO S-(-)-LIMONENO ISOLADO E
INCORPORADO A NANOEMULSÃO E NANOEMULGEL SOBRE CEPAS DE
*Klebsiella pneumoniae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Banca Examinadora

Prof^o. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande
(Orientador)

Prof^o Dr. Elquio Eleamen Oliveira
Universidade Estadual da Paraíba
(Coorientador)

Prof^a Dr^a Hílzeth de Luna Freire Pessoa
Universidade Federal da Paraíba
(Avaliador interno)

Prof^a Dr^a. Luanna Abílio Diniz Melquiades de Medeiros
Universidade Federal de Campina Grande
(Avaliador externo)

Prof^a. Dr^a. Renata Ramos Tomaz
Universidade Federal da Paraíba
(Avaliador externo)

Prof^a. Dr^a. Sonaly de Lima Silva
Faculdade de Goiana
(Avaliador externo)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM
MEDICAMENTOS (UFRN/UFPB/UFRPE/UFC)



Ata da quadragésima quarta defesa de tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos **RAVENNA LEITE DA SILVA**, candidata ao Título de “**Doutora**” em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos/UFPB.

1 Às oito horas (08:00) do dia vinte e cinco de novembro do ano de dois mil e vinte quatro
2 (25/11/2024), na sala virtual, reuniram-se em caráter de Solenidade pública os membros
3 da Comissão designada para examinar a **RAVENNA LEITE DA SILVA**, candidata ao
4 Título de “**Doutora**” em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.
5 Foram componentes da Banca Examinadora os Professores Doutores: Dr. Abrahão Alves
6 de Oliveira Filho (orientador), Prof^a. Dr^a. Luanna Abílio Diniz Melquíades de Medeiros
7 (Examinadora externo) Prof. Dr^a Hilzeth de Luna Freire Pêsoa (Examinadora interno),
8 Profa. Dra. Renata Ramos Tomaz Barbosa (Examinadora Externa) e Profa. Dra. Sonaly
9 de Lima Silva (Examinadora Externa). Dando início aos trabalhos o presidente da banca,
10 Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho (orientador), após declarar os objetivos da
11 reunião, apresentou a candidata, **RAVENNA LEITE DA SILVA**, a quem concedeu a
12 palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado
13 “**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DO S-(-)-LIMONENO ISOLADO E**
14 **INCORPORADO A NANOEMULSÃO E NANOEMULGEL SOBRE CEPAS DE *Klebsiella***
15 ***pneumoniae*”**. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de 40 minutos, a
16 candidata foi arguida pelos examinadores na forma Regimental. Em seguida passou a
17 comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho,
18 concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADA. Em face da aprovação declarou a
19 presidente achar-se a examinada, **RAVENNA LEITE DA SILVA**, legalmente habilitada a
20 receber o Título de “Doutora” em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em
21 Medicamentos, área Farmácia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências,
22 como de direito, a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Os trabalhos foram
23 encerrados determinando a leitura para fins de aprovação e a lavratura da presente ata
24 devidamente assinada por todos os membros da Banca Examinadora.

João Pessoa, em 25 de novembro de 2024.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM
MEDICAMENTOS (UFRN/UFPB/UFRPE/UFC)**



Documento assinado digitalmente
gov.br ABRAHAO ALVES DE OLIVEIRA FILHO
Data: 02/12/2024 10:53:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho (orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br HILZETH DE LUNA FREIRE PESSOA
Data: 02/12/2024 10:48:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr.^a Hilzeth de Luna Freire Pessôa (Examinador interno)

Documento assinado digitalmente
gov.br LUANA ABILIO DINIZ MELQUIADES DE MEDEIR
Data: 29/11/2024 11:42:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dr^a. Luanna Abílio Diniz Melquiades de Medeiros (Examinadora Externa)

Documento assinado digitalmente
gov.br RENATA RAMOS TOMAZ BARBOSA
Data: 30/11/2024 15:54:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Renata Ramos Tomaz Barbosa (Examinadora Externa)

Documento assinado digitalmente
gov.br SONALY DE LIMA SILVA
Data: 29/11/2024 18:07:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Sonaly de Lima Silva (Examinadora Externa).

RESUMO

Doenças relacionadas às bactérias patogênicas continuam sendo uma ameaça significativa para o corpo humano, entre as principais bactérias causadoras de infecções encontramos a *Klebsiella pneumoniae*, esta associa-se, entre outros acometimentos, às infecções em feridas da pele como as lesões por pressão. Dessa forma, analisou-se o efeito antibacteriano do S-(-)-limoneno isolado e incorporado a nanoemulsão e nanoemulgel sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Para tanto, determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do S-(-)-limoneno contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* através da técnica de microdiluição em placa com caldo Muller Hinton. Identificou-se a Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) menor concentração do agente em contato com sacarose que impediu a aderência ao tubo de ensaio. Em seguida avaliou-se a associação do S-(-)-Limoneno com os antibacterianos sintéticos pelo método de difusão em disco. Seguindo com o estudo, desenvolveu-se uma nanoemulsão contendo S-(-)-limoneno pelo método de ultrasonicação com adição de agente gelificante à nanoemulsão. Foram caracterizados quanto ao tamanho de gotícula e Índice de polidispersão (PDI) por espalhamento dinâmico de luz, assim como suas características macroscópicas e pH. Posteriormente, avaliou-se a atividade antibacteriana da nanoemulsão através CIM pelo método de microdiluição em placa e do nanoemulgel incorporado com o S-(-)-Limoneno pelo método de difusão por poço. Obteve-se CIM₅₀ do S-(-)-limoneno de 1000µg/mL, CBM acima de 1000µg/mL e ausência de atividade antiaderente, assim como, como no controle positivo com o digluconato de clorexidina a 0,12%. Os dados da associação do S-(-)-Limoneno com os antimicrobianos sintéticos demonstraram efeitos sinérgicos, indiferentes e antagônicos, onde a gentamicina apresentou efeito sinérgico com a maior parte das cepas testadas. Formulou-se nanoemulsão (NE) e nanoemulgel (NG) contendo 10% de S-(-)-Limoneno com a NE apresentando maior estabilidade do tamanho de gotícula e PDI (47,47nm e 0,2561, respectivamente) até o dia 90, e não apresentou alterações macroscópicas. O NG apresentou aumento no tamanho da gotícula e PDI após o trigésimo dia. Na investigação da CIM e CBM da nanoemulsão incorporada com o S-(-)-Limoneno observa-se a CIM₅₀ de 1000µg/mL assim como no produto isolado. Ao realizar o teste de susceptibilidade das cepas de *K. pneumoniae* ao NG incorporado com S-(-)-Limoneno observou-se um efeito antibacteriano tendo em vista a formação de um halo de inibição de 20mm. Desta forma, conclui-se que o S-(-)-Limoneno é um candidato ao desenvolvimento de novas tecnologias farmacológicas para o tratamento de lesões de pele infectadas com *K. pneumoniae* isolado ou em formulações com sistemas emulsionados.

Palavras-chaves: antimicrobiano, antibacteriano, *Klebsiella pneumoniae*, nanoemulsão, S-(-)-limoneno.

ABSTRACT

Diseases related to pathogenic bacteria continue to be a significant threat to the human body. Among the main bacteria that cause infections, we find *Klebsiella pneumoniae*, which is associated with, among other conditions, infections in skin wounds such as pressure injuries. Thus, the antibacterial effect of S-(-)-limonene isolated and incorporated into nanoemulsion and nanoemulgel on *Klebsiella pneumoniae* strains was analyzed. For this purpose, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of S-(-)-limonene against *Klebsiella pneumoniae* strains were determined using the microdilution technique on a Muller Hinton broth plate. The Minimum Inhibitory Concentration of Adhesion (MIC) was identified, the lowest concentration of the agent in contact with sucrose that prevented adhesion to the test tube. The association of S-(-)-Limonene with synthetic antibacterials was then evaluated by the disk diffusion method. Following the study, a nanoemulsion containing S-(-)-limonene was developed by the ultrasonication method with the addition of a gelling agent to the nanoemulsion. They were characterized in terms of droplet size and polydispersity index (PDI) by dynamic light scattering, as well as their macroscopic characteristics and pH. Subsequently, the antibacterial activity of the nanoemulsion was evaluated by MIC by the plate microdilution method and of the nanoemulgel incorporated with S-(-)-Limonene by the well diffusion method. The MIC₅₀ of S-(-)-limonene was 1000 µg/mL, MBC above 1000 µg/mL and absence of antiadherence activity were obtained, as well as in the positive control with 0.12% chlorhexidine digluconate. The data from the association of S-(-)-Limonene with synthetic antimicrobials demonstrated synergistic, indifferent and antagonistic effects, where gentamicin presented a synergistic effect with most of the tested strains. Nanoemulsion (NE) and nanoemulgel (NG) containing 10% S-(-)-Limonene were formulated, with NE presenting greater stability of droplet size and PDI (47.47 nm and 0.2561, respectively) until day 90, and did not present macroscopic changes. NG showed an increase in droplet size and PDI after the thirtieth day. In the investigation of the MIC and MBC of the nanoemulsion incorporated with S-(-)-Limonene, the MIC₅₀ was 1000 µg/mL, as well as in the isolated product. When performing the susceptibility test of *K. pneumoniae* strains to NG incorporated with S-(-)-Limonene, an antibacterial effect was observed, considering the formation of an inhibition halo of 20 mm. Thus, it is concluded that S-(-)-Limonene is a candidate for the development of new pharmacological technologies for the treatment of skin lesions infected with *K. pneumoniae* alone or in formulations with emulsified systems.

Keywords: antimicrobial, antibacterial, *Klebsiella pneumoniae*, nanoemulsion, S-(-)-limonene.

“Não te mandei eu? Esforça-te e tem bom ânimo; não te atemorizes, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus está contigo, por onde quer que andares”.
(Josué 1:9)

À YHWH.

AGRADECIMENTOS

Escrevo esses agradecimentos após 36h de trabalho. Sim, 36h. A vida “comum” do profissional de saúde brasileiro (infelizmente, vale ressaltar). Confesso que estou bastante cansada, mas decidi ligar o computador e escrever estes agradecimentos, talvez este seja o momento de maior vulnerabilidade e representatividade de tudo o que foram estes anos de doutorado. Na verdade, escrevo sobre um período que vai muito além dos anos desse.

O início dessa jornada antecede, e muito, a aprovação e matrícula. Trata-se de uma caminhada desde quando decidi que queria seguir uma carreira acadêmica ainda na graduação, passando por especialização, mestrado, docência e doutorado, isto tudo, em concomitância com o trabalho (sim, fiz ambos sem bolsa e trabalhando). Neste momento, não sei se consigo mensurar o preço pago para chegar até aqui, eu só sei que foi alto ... bem alto. Acho que só Deus sabe mesmo.

Entretanto, o que pode soar como algo penoso, não o é. Eu só posso dizer o quanto sou grata e o quanto fui (e sou) abençoada com todo este processo. Primeiramente, por ser filha de um Deus fiel, justo, pai amoroso, a Ele dedico este trabalho. Sou extremamente grata e feliz por ter ao meu lado uma mãe amorosa, forte e guerreira que ensinou suas filhas sobre o valor dos estudos, Dona Damiana (vulgo, mainha) este trabalho também é fruto da sua dedicação. Minha irmã, Álida, você sempre foi apoiadora e impulsionadora dos meus sonhos, Deus foi muito bom quando me deu você como irmã.

Meu orientador, Prof^o. Dr. Abrahão Alves, através da sua bondade, orientação e suporte, este trabalho foi possível ser realizado. Vejo Deus no senhor enquanto docente.

À amiga maravilhosa que ganhei com este doutorado, Andrea Fernanda, que me ajudou em incontáveis momentos, fossem eles relacionados ao doutorado ou não. Desejo que o Senhor faça cumprir toda promessa feita por Ele na sua vida. Você é alegria e luz onde chega, e isso é testemunhado por todos que convivem com você.

Às amigas que andaram comigo este percurso mesmo sem ser delas: Janaína, Sabrina, Renata, Fernanda, Sonaly e Ana Isabele. Quantas vezes vocês não foram a mão, cuidado e presença de Deus em minha vida nos momentos que eu estava precisando. Quantas vezes me emprestaram “seus ouvidos” e “seus

ombros” para que eu pudesse conversar, desabafar, chorar, me desesperar (hehehe)? Nem sei precisar. Mas em todos fui acolhida. Deus as abençoe grandemente.

Ao meu coorientador, Prof^o. Dr. Elquio Eleamen, com certeza sem sua orientação, ensino e ajuda a conclusão deste trabalho não seria possível. Fui recebida e acolhida pelo seu laboratório e todos que o compõem, isto representa, antes de tudo, sua forma de trabalho, seu perfil de pesquisador e ser humano que é. Desejo bênçãos sem medida em sua vida.

À Prof^a Dr^a Hilzeth Pessoa por tamanha generosidade em nos ceder seu laboratório para a realização dos ensaios microbiológicos, sem sombra de dúvidas uma mão amiga estendida em momentos importantes e cruciais. A senhora exala bondade, humildade e amor. É uma inspiração enquanto pesquisadora e docente por tamanha capacidade de juntar humanidade e competência técnico-científica.

A todos os integrantes da minha banca por toda contribuição valiosa e disponibilidade de tempo dedicada à melhoria deste trabalho. Sem sombra de dúvida, este trabalho não seria o mesmo sem vocês.

Por último, e não menos importante, não poderia deixar de citar aqui meus companheiros de estudos pela madrugada e fins de semana, nossos animaizinhos de estimação. Sim, só quem os têm sabe o companheirismo e carinho que recebemos dos mesmos e quanto tornam nossos dias melhores. Mel, Maribel, Boris e Rubi, amo e amarei sempre cada um.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização e conclusão desta trajetória, deixo aqui meu agradecimento. Que o Senhor o abençoe.

Amém.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cultura de <i>K. pneumoniae</i> ao microscópio ótico por meio de coloração de Gram	21
Figura 2 - Apresentação esquemática dos fatores de virulência da <i>Klebsiella pneumoniae</i> e da homeostase do biofilme	22
Figura 3 - Locais de acometimento de infecção documentada por <i>K. pneumoniae</i>	23
Figura 4 - Visão esquemática da infecção bacteriana da pele, derivada da perda da integridade da epiderme.....	26
Figura 5 - Estruturas químicas do R-(+)-limoneno e de S-(-)-Limoneno, respectivamente	31
Figura 6 - Tipos de separação em emulsões.....	36
Figura 7 - Fluxograma metodológico.	38
Figura 8 - Tamanho da gotícula e PDI das NEs e NGs com e sem propilenoglicol (NEL, NGL, NEG e NGG).....	52

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Características das cepas clássicas e hipervirulentas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
Quadro 2 – Genes de resistência antimicrobiana da <i>K. pneumoniae</i>	28
Quadro 3 - Parâmetros para Avaliação das Características Macroscópicas.	44
Tabela 1 – Valores obtidos da CIM e CBM do S-(-)-Limoneno contra cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	46
Tabela 2 – Avaliação da associação do S-(-)-limoneno com os antibacterianos sintéticos frente a cepas <i>Klebsiella pneumoniae</i>	47
Tabela 3 – Tamanho médio da gotícula e PDI em diferentes valores de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de 09 a 15 das nanoemulsões contendo S-(-)-Limoneno	48
Tabela 4 – Otimização dos parâmetros de formulação, tamanho de gotícula e PDI.	48
Tabela 5 - Tamanho da gotícula, PDI e características macroscópicas da nanoemulsão contendo 10% S-(-)-Limoneno (NEL).....	49
Tabela 6 - Tamanho da gotícula, pH PDI e características macroscópicas do nanoemulgel contendo 10% S-(-)-Limoneno (NGL).	50
Tabela 7 - Tamanho da gotícula, pH PDI e características macroscópicas das NEs com propilenoglicol.....	50
Tabela 8 – Tamanho da gotícula, PDI, pH e características macroscópicas do nanoemulgel com propilenoglicol (NGG).....	52
Tabela 9 – Valores obtidos da CIM e CBM da Nanoemulsão com 10% de S-(-)-limoneno contra cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AB - Antibacteriano

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CHX - Clorexidina

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CIM₅₀ - Concentração Inibitória Mínima 50

CIMA - Concentração Inibitória Mínima de Aderência

cKP - *Klebsiella pneumoniae* clássica

CSTR - Centro de Saúde e Tecnologia Rural

DMAPP - Dimetilalil difosfato

DNA - ácido desoxirribonucleico

EHL - Equilíbrio Hidrofílico-lipofílico

ESBL - Beta-lactamase de espectro estendido

ESKAPE - *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*

EUA - Estados Unidos da América

hvKP - *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta

IC₅₀ – Concentração Inibitória Média

IDT - Ingestão diária tolerável

IH - Infecções hospitalares

IPP - Isopentenil difosfato

IRAS - Infecções relacionadas à assistência de saúde

ITU - Infecções do trato urinário

KP - *Klebsiella pneumoniae*

LPP- Lesão por Pressão

LPS - Lipopolissacarídeo

LSVM - Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas

MDR cKP - cKPs multirresistentes

MDR-KP - *K. pneumoniae* que codifica a carbapenemase

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina
NE - Nanoemulsão
NG - Nanoemulgel
NEL - Nanoemulsão contendo 10% S-(-)-limoneno
NGL - Nanoemulgel contendo 10% S-(-)-limoneno
NEG - Nanoemulsão contendo 10% S-(-)-limoneno e 5% de propilenoglicol
NGG - Nanoemulgel contendo 10% S-(-)-limoneno e 5% de propilenoglicol
nm - Nanômetro
O/A - Óleo/Água
OE - Óleo essencial
OMS - Organização Mundial da Saúde
OMS - Organização mundial de Saúde
PDI - Índice de polidispersão
pH - potencial hidrogeniônico
RAM - resistência antimicrobiana
RNA - ácido ribonucleico
SARS-CoV-2 - Coronavirus 2 da síndrome respiratória aguda grave
TLR4 - Receptor tipo toll 4
UACB - Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas
UEPB - Universidade Estadual da Paraíba
UFC/mL - Unidades formadoras de colônias por mililitro
μL - Microlitro
μg/mL - Micrograma por mililitro
UFCG - Universidade Federal de Campina Grande
XDR cKP - cKPs extensivamente resistentes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
3.1 <i>Klebsiella Pneumoniae</i> : aspectos gerais, virulência e resistência bacteriana	23
3.2 Produtos naturais da classe dos Terpenos com potencial antibacteriano.....	32
3.2.1 Limoneno: características e aplicabilidade	33
3.3 Formas farmacêuticas nanotecnológicas	37
4 MATERIAL E MÉTODO	41
4.1 Área de estudo e localização de teste experimentais	41
4.2 Metodologia dos estudos microbiológicos.....	42
4.2.1 Micro-organismos e Produto-teste.....	42
4.2.2 Meios de cultura.	42
4.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	42
4.2.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).	43
4.2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA).....	43
4.2.6 Estudo de associação do S-(-)-Limoneno com os antibacterianos sintéticos frente a cepas <i>Klebsiella pneumoniae</i>	44
4.3 Metodologia para o desenvolvimento e caracterização dos sistemas emulsionados incorporados com o S-(-)-Limoneno.....	44
4.3.1 Materiais.....	44
4.3.2 Teste de Identificação do Equilíbrio Hidrofílico-lipofílico (EHL) do S-(-)-Limoneno	45
4.3.3 Otimização dos parâmetros de formulação	45
4.3.4 Produção e nanoemulgeis incorporados com o S-(-)-Limoneno.....	46
4.3.5 Caracterização das nanoemulsões e nanoemulgeis incorporados com o S-(-)-Limoneno	46
4.4 Atividade antibacteriana da nanoemulsão e do nanoemulgel incorporado com o S-(-)-Limoneno	47

4.5 Análise estatística	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 Estudos da atividade antibacteriana do S-(-)-Limoneno contra <i>Klebsiella</i> <i>Pneumoniae</i>	49
5.2 Desenvolvimento e caracterização dos sistemas emulsionados incorporado com o S-(-)-Limoneno	50
5.3. Atividade antibacteriana da nanoemulsão e do nanoemulgel incorporados com o S-(-)-Limoneno.	56
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS.....	81
ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO COM AUTORIA PRINCIPAL REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E SAÚDE – REBES.....	82
ANEXO B – ARTGO PUBLICADO COM CO-AUTORIA NA <i>BRAZILIAN JOURNAL</i> <i>OF BIOLOGY</i>	83

1 INTRODUÇÃO

As bactérias são procariotos, apresentam uma organização celular típica e são classificadas de acordo com sua parede celular em Gram-positivas e Gram-negativas. Estas obtêm nutrientes principalmente pela incorporação de pequenas moléculas através da parede celular, como aminoácidos, oligossacarídeos e pequenos peptídeos e sua taxa de crescimento e divisão depende, em grande parte, da disponibilidade de nutrientes do ambiente (Goering *et al.*, 2020). O crescimento bacteriano pode ser inibido por agentes antimicrobianos, causando interrupção de funções celulares vitais, resultando em morte celular rápida (Tavares *et al.*, 2020).

Entre as dez principais ameaças globais à saúde divulgadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2019, seis estavam relacionadas a doenças infecciosas (pandemia global de gripe; resistência antimicrobiana; ebola e outros patógenos de alta ameaça; hesitação vacinal; dengue; vírus da imunodeficiência humana). Foi estimado que em 2019, o número de mortes devido a doenças infecciosas foi de 13,7 milhões, enquanto as mortes associadas a bactérias foram classificadas como a segunda principal causa de morte globalmente (Zhang *et al.*, 2024).

As infecções associadas aos cuidados de saúde representam uma importante preocupação referente à segurança dos pacientes nos países em desenvolvimento, havendo uma prevalência global de até 15,5% de infecções relacionadas aos procedimentos de saúde, podendo chegar a 34,1% em pacientes gravemente enfermos nestes países (Gidey *et al.*, 2023).

Entre as principais bactérias patogênicas causadoras de infecções hospitalares encontramos a *Klebsiella pneumoniae* que se trata de um bacilo Gram negativo pertencente à microbiota oral, isolado rotineiramente em indivíduos imunodeprimidos, hospitalizados e que contenham uma doença base. Nestes pacientes, as bactérias provocam principalmente a pneumonia, as infecções em feridas, a bacteremia, a rinite crônica e atrófica, as artrites, as enterites e as meningites em crianças (Sousa, Ramalho e Camargo, 2020).

Dentre as infecções em feridas pode-se destacar a Lesão por Pressão (LPP) que são consideradas um dos principais prejuízo para a integridade da pele e é caracterizada por dano localizado na pele e/ou tecidos moles subjacentes,

geralmente sobre uma proeminência óssea ou relacionada a um dispositivo médico ou outro (Thomé *et al.*, 2018; Peres *et al.*, 2022).

Para Segala *et al.* (2021) a pandemia de SARS-CoV-2 (sigla do inglês que significa coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave) levou a uma interrupção maciça dos sistemas de saúde em todos os níveis. Em ambientes de terapia intensiva, a exposição inadequada aos antimicrobianos e a descontinuação das medidas de controle de infecção podem direcionar a seleção e a difusão de patógenos resistentes a medicamentos.

Diante disso, é de suma importância pesquisas e investimentos na tecnologia e desenvolvimento de medicamentos, em especial, na área de microbiologia para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos com potencial antibacteriano contra a *Klebsiella pneumoniae*. Os produtos naturais e seus derivados são reconhecidamente importantes na pesquisa farmacológica e nos últimos anos estes têm sido berço para estudos, resultando em novas opções promissoras de tratamento (Scorzoni *et al.*, 2016).

No tocante aos derivados naturais destacam-se os terpenos, que são metabólitos secundários presentes abundantemente na natureza, e que compreendem substâncias de importante função nos processos patológicos (Lima *et al.*, 2021). Na classe dos terpenos podemos destacar o Limoneno, que se trata de um monoterpeno de metabolismo secundário principalmente em plantas do gênero *Citrus* sendo encontrado nas isoformas R-(+)-limoneno e S-(-)-limoneno (Silva *et al.*, 2021).

O limoneno existe como dois isômeros ópticos, denominados R ou d- e S ou l-limoneno. R-(+)-limoneno (d-limoneno) é um aditivo de sabor comumente usado em alimentos e fragrâncias por seu agradável aroma semelhante ao limão. Ambos os enantiômeros R e S existem em espécies de coníferas como uma mistura racêmica (Silva *et al.*, 2021; Muilu-mäkelä *et al.*, 2022). Vários estudos relataram que os óleos essenciais contendo limoneno possuem diferentes atividades biológicas, incluindo atividades antimicrobianas (Espina *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2021; Muilu-mäkelä *et al.*, 2022). Todavia, a aplicação do S-(-)-limoneno contra cepas de *K. pneumoniae* continua escassa na literatura.

Apesar dos óleos essenciais (OE) e seus constituintes biológicos fornecerem uma fonte distinta, inesgotável e nova de agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos e antiparasitários, devido à sua natureza volátil, susceptibilidade

química e fraca solubilidade, o seu desenvolvimento como antimicrobianos é limitado (Nair *et al.*, 2022).

Sistemas de entrega de medicamentos estão sendo extensivamente empregados para aumentar a biodisponibilidade de medicamentos pouco solúveis. Estes têm a capacidade de incorporar moléculas lipofílicas e hidrofílicas e protegê-las contra a degradação. Para tanto, existem vários atributos físicos dos nanocarreadores lipídicos que determinam a sua segurança, estabilidade, eficácia, bem como o seu comportamento *in vitro* e *in vivo* (Danaei *et al.*, 2018).

Estes incluem o tamanho/diâmetro médio das partículas e o índice de polidispersão (PDI), que é uma indicação da sua qualidade no que diz respeito à distribuição de tamanho. A adequação das formulações de nanocarreadores para uma determinada via de administração de medicamentos depende do seu diâmetro médio, Índice de polidispersão (PDI) e estabilidade de tamanho, entre outros parâmetros. O controle e a validação desses parâmetros são de fundamental importância para as aplicações clínicas eficazes de formulações de nanocarreadores (Danaei *et al.*, 2018).

Desta forma, sabendo da escassez de estudos microbiológicos do S(-)-limoneno contra as cepas de *Klebsiella Pneumoniae*, da alta taxa de morbimortalidade e impacto socioeconômico das infecções bacterianas no contexto mundial faz-se necessário a realização de estudos voltados para a atividade antimicrobiana do composto estudado isolado e em formulações como nanoemulsão (NE) e nanoemulgel (NG).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito antibacteriano do S-(-)-limoneno isolado e incorporado a nanoemulsão e nanoemulgel sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae*

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do S-(-)-limoneno contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*;
- Avaliar a associação do S-(-)-limoneno com os antibacterianos sintéticos frente a cepas *Klebsiella pneumoniae*;
- Desenvolver e caracterizar nanoemulsão incorporada com S-(-)-limoneno quanto ao tamanho da gotícula, índice de polidispersão, potencial hidrogeniônico e características macroscópicas;
- Avaliar a sua CIM e CBM da nanoemulsão incorporada com S-(-)-limoneno contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*;
- Desenvolver e caracterizar nanoemulgel incorporado com S-(-)-limoneno quanto ao tamanho da gotícula, índice de polidispersão, potencial hidrogeniônico e características macroscópicas;
- Avaliar sua atividade antibacteriana do nanoemulgel incorporado com S-(-)-limoneno frente a cepas *Klebsiella pneumoniae*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 *Klebsiella Pneumoniae*: aspectos gerais, virulência e resistência bacteriana

As bactérias pertencentes ao gênero *Klebsiella spp.* são bactérias Gram-negativas em forma de bastonete que podem viver em uma ampla variedade de ambientes e um membro da família *Enterobacteriaceae* (Santajit; Indrawattana, 2016). O gênero *Klebsiella* contém mais de uma dúzia de espécies, muitas das quais causam infecções oportunistas em humanos. O complexo de espécies incluindo *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae*, *K. varicola* e *K. africanensis*, causa a maior carga de doenças em humanos (Wyres; Holt, 2018; Gonzalez-Ferrer *et al.*, 2021).

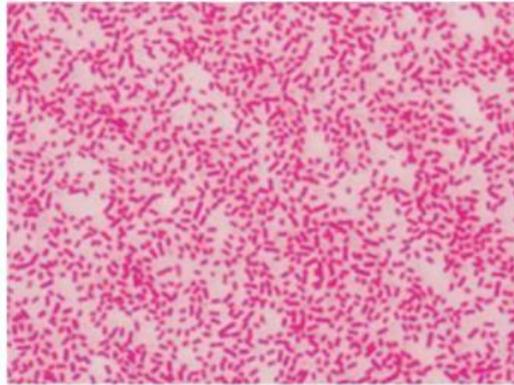
As infecções causadas por *K. pneumoniae* (KP) incluem pneumonia, abscessos hepáticos, bacteremia, infecções de tecidos moles, infecções do trato urinário (ITU), endoftalmite e meningite (Paczosa; Meccas, 2016). As possibilidades pelas quais *Klebsiella spp.* causam infecções mais frequentes em comparação com outros patógenos oportunistas Gram-negativos incluem a capacidade de resistir à fome, resistir naturalmente aos antibacterianos, superar outras bactérias, trocar prontamente de ácido desoxirribonucleico (DNA) com outros membros do microbioma humano e adquirir elementos genéticos móveis que codificam uma ampla gama de genes de resistência a antibacterianos e de aumento de virulência (Gonzalez-Ferrer *et al.*, 2021).

A *K. pneumoniae* tornou-se uma das principais causas mundiais de infecções nosocomiais, principalmente infecções respiratórias, com uma taxa de mortalidade crescente em indivíduos imunossuprimidos, recém-nascidos e idosos. É um organismo identificado como uma ameaça urgente à saúde humana devido ao seu fácil contágio entre seres humanos, à sua virulência, aumento da resistência aos antibacterianos e à sua ampla distribuição geográfica (World Health Organization, 2020; World Health Organization, 2022).

Bioquimicamente pode ser identificada através de provas de: lisina positiva, citrato e indol negativos, tríplice açúcar ferro (TSI) positivo com produção de gás, ornitina descarboxilase negativa, metabolização da lactose, hidrólise da ureia e utilização do citrato como fonte de carbono, além disso, na cultura de ágar *MacConkey* suas colônias, crescem rápido, apresentando-se em grande número e

com de cor rósea brilhante, em decorrência de ser lactase positiva (Figura 1) (Ferreira (2022)).

Figura 1 - Cultura de *K. pneumoniae* ao microscópio ótico por meio de coloração de Gram.



Fonte: Adaptado de Ferreira (2022).

A KP pode ser categorizada em *Klebsiella pneumoniae* clássica (cKP) e *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta (hvKP) de acordo com suas características fenotípicas e genotípicas, esta última tem maior virulência e pode causar doenças infecciosas graves (Han *et al.*, 2022).

A cKP é uma bactéria oportunista que causa infecções associadas à assistência à saúde em hospedeiros com comorbidades associadas que são imunocomprometidos ou que realizam manobras invasivas (por exemplo, dispositivos intravasculares, tubo endotraqueal ou ferida cirúrgica). Já hvKP é melhor descrita como um patógeno virulento, a maioria das infecções relatadas pela hvKP são adquiridas na comunidade, estes são capazes de infectar indivíduos saudáveis de qualquer idade, bem como causar múltiplas infecções e/ou subsequente disseminação (Mohamed *et al.*, 2024).

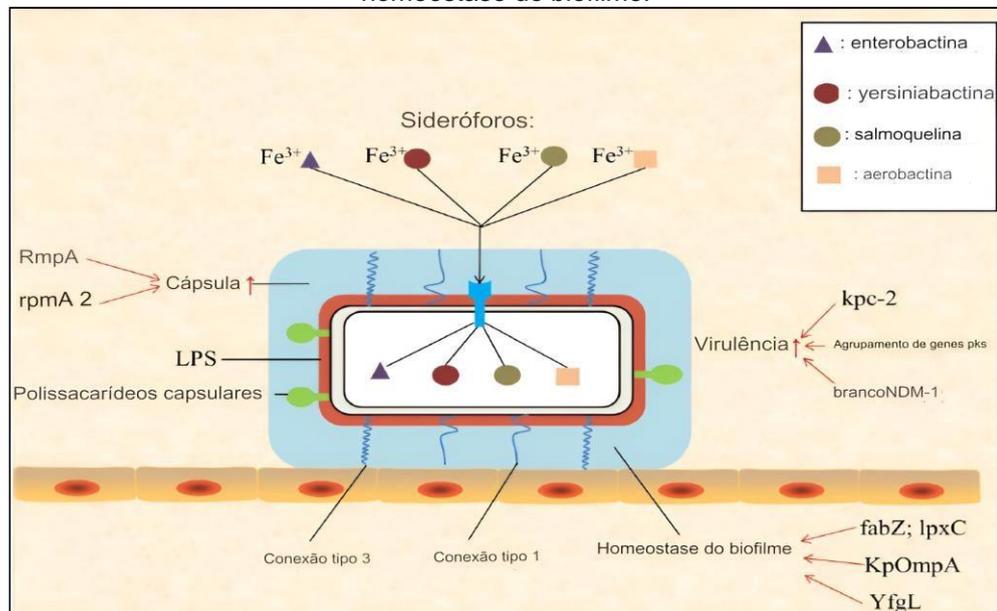
Um caso único de *K. pneumoniae* causado por abscesso hepático juntamente com endoftalmite foi relatado pela primeira vez em Taiwan na década de 1980, e o organismo causador foi designado como hvKP, desde então, o hvKP foi reconhecido como outro patótipo circulante além do clássico cKP, associado a alta patogenicidade e mortalidade por hipervirulência (Lan *et al.*, 2020). Os fatores que contribuem para a hipervirulência incluem principalmente cápsula, sideróforos, lipopolissacarídeo (LPS) e fímbrias (ou pili) (Parrott *et al.*, 2020).

Segundo Wang *et al.* (2020) e Liu *et al.* (2020) a *K. pneumoniae* é composto por adesinas, pili tipo 1 e tipo 3, e promove adesão bacteriana a células epiteliais,

imunes e superfícies abióticas. RmpA é um fator de virulência localizado no plasmídeo da KP, regulando a síntese de polissacarídeos capsulares e significativamente associadas ao fenótipo de hvKP com alto teor de muco e à infecção purulenta do tecido. Embora a cápsula desempenhe um papel vital na proteção de *K. pneumoniae* das respostas imunitárias do hospedeiro, a sua virulência pode ser causada por outros fatores.

O LPS nas principais cepas de *K. pneumoniae* pode ser modificado em parte, e isso faz com que KP não seja reconhecida pela célula hospedeira, enquanto outras cepas podem usar a cápsula para camuflar o LPS e evitar a detecção do receptor tipo toll 4 (TLR4). A resposta inflamatória é inibida e a depuração para bactérias é reduzida por essas modificações. Ao mesmo tempo, a capacidade de obter ferro é fundamental para o crescimento e replicação das bactérias, devido a isso existem quatro moléculas absorventes de ferro (transportadores de ferro) na *K. pneumoniae*: enterobactina, yersiniabactina, salmochelina e aerobactina, respectivamente (Wang *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020). A Figura 2 apresenta esquematicamente esses fatores.

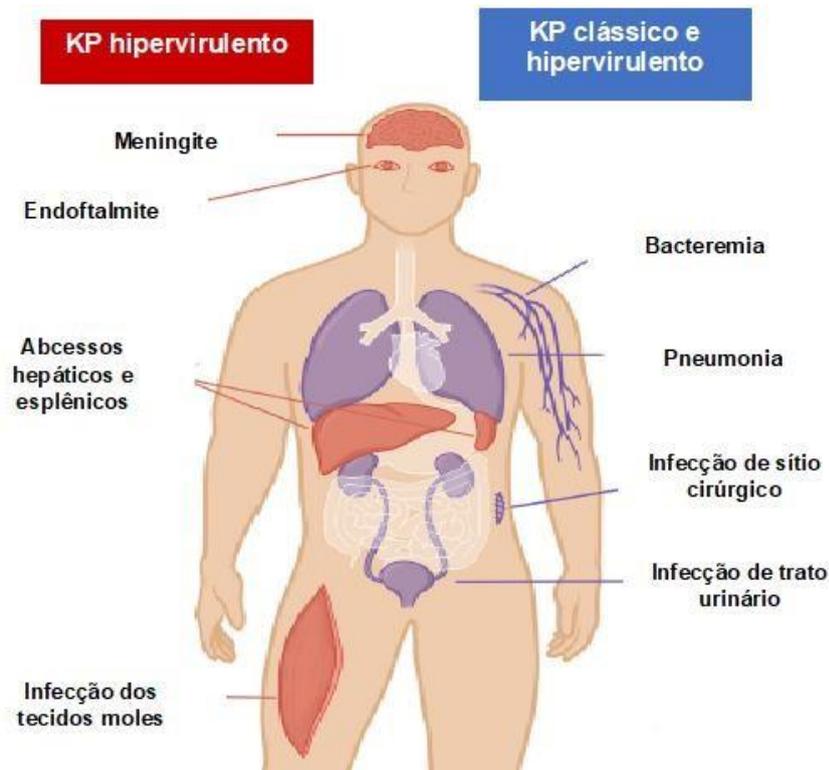
Figura 2: Apresentação esquemática dos fatores de virulência da *Klebsiella pneumoniae* e da homeostase do biofilme.



Fonte: Adaptado de Wang *et al.* (2020). **Legenda:** Fe^{3+} = ferro com número de oxidação +3 ou ferro (III) ou férrico; RmpA = gene regulador do fenótipo mucóide A; LPS = Lipopolissacarídeo; kpc-2 = variante da carbapenemase KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase); NDM-1 = New Delhi Metallo-beta-lactamase.

Pacientes com infecções por *K. pneumoniae* apresentam tendência à disseminação metastática para locais distantes, as apresentações do hvKP são diversas e distintas das infecções causadas pelo cKP. O hvKP causa infecções invasivas adquiridas na comunidade caracterizadas por abscessos hepáticos e infecções metastáticas do pulmão, olhos, sistema nervoso central, sistema musculoesquelético e trato urinário (Choby *et al.*, 2019). Em contraste com o hvKp, o cKp causa infecções com mais frequência e surge comumente no ambiente hospitalar como, pneumonia adquirida no hospital, infecções do trato urinário e bacteremia em pacientes imunocomprometidos com comorbidades (Gonzalez-Ferrer *et al.*, 2021) (Figura 3).

Figura 3 - Locais de acometimento de infecção documentada por *K. pneumoniae*.



Fonte: Adaptado de Gonzalez-Ferrer *et al.* (2021). **Legenda:** As infecções hvKP (mostradas em vermelho) são frequentemente adquiridas na comunidade e causam infecções do sistema nervoso central, olhos, fígado, baço e tecidos moles. Infecções por cKP, que frequentemente evoluem com multirresistência, comumente surgem em ambiente hospitalar. Descobriu-se que *K. pneumoniae* clássica e hipervirulenta (mostrada em roxo) causam bacteremia, pneumonia, infecções de sítio cirúrgico e infecções do trato urinário.

As cKP adquiriram extensivamente elementos genéticos móveis que codificam genes de resistência antimicrobiana. A beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e a *K. pneumoniae* que codifica a carbapenemase (conjuntamente

referidas como MDR-KP) estão disseminadas globalmente e causam infecções que muitas vezes são difíceis de tratar, colocando a MDR-KP no topo das listas atuais de ameaças significativas para saúde pública pela Organização mundial de Saúde (OMS). A resistência a múltiplas drogas do MDR-Kp e a correspondente suscetibilidade antimicrobiana do hvKP é uma distinção importante entre esses dois patógenos (Russo *et al.*, 2018; Clegg; Murphy, 2016; Paczosa; Meccas, 2016). O quadro abaixo resume as principais características de ambas as cepas.

Quadro 1 – Características das cepas clássicas e hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae*

Característica(s) para tipo de capa		
Parâmetro	Clássico	Hipervirulento
Tipos comuns de infecção	Pneumonia, ITU, bacteremia	Abscesso hepático piogênico; bacteremia; abscessos pulmonares, cervicais e renais; pneumonia; celulite; fascíte necrosante; miosite, meningite; endoftalmite
População(ões) suscetível(s)	Imunossuprimidos (diabéticos, pacientes com doenças malignas)	Diabéticos, pessoas saudáveis
Tipo(s) de cápsula	Sorotipos de cápsula K1–K78	Sorotipo de hipercápsula K1 (93%) ou K2
Sideróforos (% de cepas que expressam sideróforo)	Enterobactina (100), yersiniabactina (17–46), salmochelina (2–4), aerobactina (6)	Enterobactina (100), yersiniabactina (90), salmochelina (>90), aerobactina (93–100)
Tipo de infecção adquirida principalmente	Nosocomial	Aquisição comunitária
Frequência de relatos de resistência a antibacterianos	Frequente (produtora de ESBL e carbapenemases)	Pouco frequente

Fonte: Paczosa e Meccas (2016)

Até recentemente, a maioria dos hvKP eram sensíveis aos antimicrobianos, em contraste com as cepas cKPs, que eram mais frequentemente multirresistentes (MDR cKP) ou extensivamente resistentes (XDR cKP) a medicamentos. Infelizmente, hvKP MDR, hvKP produtor de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), hvKp resistente à polimixina e hvKP resistente a carbapenêmicos está surgindo e pode substituir a *K. pneumoniae* clássica como o patógeno dominante nosocomial e associado às infecções relacionadas aos cuidados de saúde (ou infecções hospitalares e nosocomiais) (Liu *et al.*, 2020).

As Infecções hospitalares (IH) ou Infecções relacionadas à assistência de saúde (IRAS) são consideradas um problema de saúde pública, por aumentarem a mortalidade e a morbidade, aumentarem o tempo de internação e os custos muito

elevados com a saúde. Na Europa, as IRAS causam 16 milhões de dias de hospitalização adicionais por ano, com custos superiores a 7 mil milhões de euros anuais. A prevalência de IRAS em países de alta renda é de 7,5%, embora outros tenham relatado taxas de 5,7% a 7,1% na Europa e 4,5% nos Estados Unidos da América (EUA), enquanto em países de baixa e média renda a taxa de prevalência varia entre 5,7% e 19,2% (Voidazan *et al.*, 2020).

O número crescente de agentes patogénicos resistentes aos antimicrobianos, que estão cada vez mais associados à infecção hospitalar, representa um fardo significativo para os sistemas de saúde e tem custos económicos globais importantes. Os efeitos incluem altas taxas de mortalidade e morbidade e aumento dos custos de tratamento. Relatórios recentes utilizando dados de estudos de vigilância hospitalares, bem como da *Infectious Diseases Society of America*, começaram a referir-se a um grupo de patógenos nosocomiais como “patógenos ESKAPE”, espécies *Enterobacter* (Rice *et al.*, 2008).

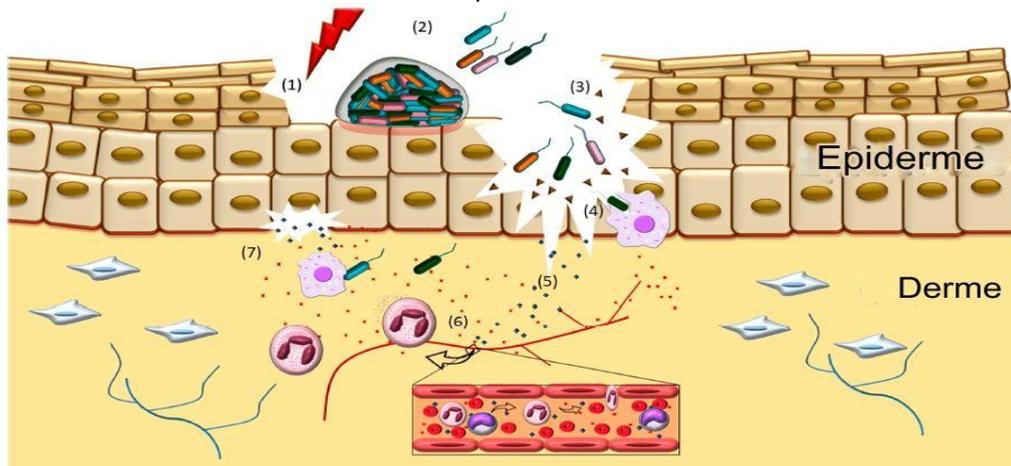
O grupo de bactérias conhecido como ESKAPE que é um acrónimo para o conjunto de bactérias, abrangendo espécies Gram-positivas e Gram-negativas, composto por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* estando entre as bactérias mais prevalentes nas infecções cutâneas (Santajit; Indrawattana, 2016).

A pele é o maior órgão do corpo humano, atuando como barreira física e imunológica contra microrganismos patogénicos. As lesões cutâneas constituem porta de entrada para contaminação microbiana que pode levar a feridas crónicas e outras infecções invasivas, adicionalmente, as feridas crónicas são consideradas graves problemas de saúde pública devido às consequências sociais, psicológicas e económicas que acarretam (Macedo *et al.*, 2021).

Uma vez rompida a integridade tecidual, uma cascata de reações bioquímicas do processo cicatricial é ativada para reparar o dano com fases distintas e sobrepostas que compreendem homeostase, inflamação, proliferação, reepitelização e remodelação tecidual. Contudo, a presença de microrganismos patogénicos prolonga o período de inflamação provocando liberação exacerbada de mediadores inflamatórios em resposta à persistência bacteriana (Figura 4) (Rahim *et al.*, 2017; Macedo *et al.*, 2021). Nesse sentido, as infecções microbianas são destacadas como as causas mais importantes de feridas crónicas, entre elas as lesões por pressão, e geralmente estão associadas à formação de biofilme, que são

notoriamente recalcitrantes aos antibacterianos convencionais (Morgan *et al.*, 2019). A lesão tecidual e a resposta ao processo infeccioso ocorre, resumidamente, nas seguintes etapas apresentadas na Figura 4.

Figura 4 - Visão esquemática da infecção bacteriana da pele, derivada da perda da integridade da epiderme.



Fonte: Adaptado de Macedo *et al.* (2021). **Legenda:** (1) Uma lesão provoca uma ferida cutânea que constitui porta de entrada para contaminação microbiana; (2) As bactérias colonizam a pele e produzem um biofilme; (3) As bactérias secretam toxinas que prolongam a degradação tecidual, atingindo a camada dérmica; (4) As células imunes residentes reconhecem as bactérias e secretam mediadores imunológicos para neutralizar os patógenos e recrutar outras células imunes; (5) Detritos celulares (padrões moleculares associados a danos – DAMPS - e mediadores lipídicos) ativam células imunológicas e servem como quimioatratantes; (6) Os leucócitos sanguíneos são recrutados para combater os patógenos; (7) Substâncias efetoras liberadas pelas células do sistema imunológico também promovem danos aos tecidos e amplificam a inflamação.

Apesar do desenvolvimento de várias formulações antimicrobianas (contendo derivados de prata, mupirocina, ácido fusídico, mafenida, gentamicina, bacitracina, neomicina e polimixina B), o tratamento de infecções cutâneas relacionadas com ESKAPE ainda é desafiador. Este cenário se deve à capacidade da bactéria ESKAPE de adquirir perfis de multirresistência (MDR), extensa resistência a medicamentos (XDR) e pan-resistência a medicamentos (Punjataewakupt; Napavichayanun; Aramwit, 2019; Rahimi *et al.*, 2020).

De fato, determinantes de resistência e plasmídeos que medeiam a resistência a antibacterianos tópicos, como mupirocina, ácido fusídico, neomicina e prata, foram detectados em isolados clínicos de bactérias ESKAPE. Além disso, esses patógenos apresentam alto índice de incidência em ambientes hospitalares e diversas cepas apresentam fenótipos de multirresistência. Assim como, determinantes de resistência e plasmídeos que medeiam a resistência a

antibacterianos tópicos, como mupirocina, ácido fusídico e neomicina e prata, foram detectados em isolados clínicos de bactérias (Santajit; Indrawattana, 2016; Macedo *et al.*, 2021).

A resistência antimicrobiana é descrita como a capacidade dos microrganismos sobreviverem na presença de agentes antimicrobianos em concentrações normalmente suficientes para inibi-los ou matá-los. Pode ainda ser explicado como um processo multifatorial que, do ponto de vista bacteriano, representa uma associação de exposição contínua a antibacterianos e à plasticidade do genoma microbiano (Watkins; Bonomo, 2016; Gorrie *et al.*, 2022).

Conseqüentemente, esta evolução levou ao surgimento de cepas de *Enterobacteriaceae* MDR e XDR, que são resistentes a quase todos os antibacterianos atualmente em uso. A propagação da MDR *Klebsiella pneumoniae* está principalmente associada a ambientes clínicos onde é facilitada por fatores como espaço fechado e propagação entre pacientes que são tipicamente imunocomprometidos através do que é denominado infecções hospitalares (Ndlovu *et al.*, 2023).

A crise de resistência antimicrobiana (RAM) que os hospitais enfrentam em todo o mundo é impulsionada pelos patógenos ESKAPE que são responsáveis pela maioria das infecções em pacientes que são difíceis de tratar com terapia antimicrobiana (Pendleton; Gorman, 2016; Wyres; Holt, 2018).

Os antibacterianos da classe das cefalosporinas e dos carbapenêmicos têm sido a base do tratamento de infecções graves causadas por *Enterobacteriaceae*, como *K. pneumoniae*, mas a eficácia tem sido comprometida pela aquisição generalizada de genes que codificam enzimas, como as lactamases de espectro estendido e carbapenemases, que medeiam a respectiva resistência a essas drogas críticas e apresentando taxas de mortalidade, muitas vezes superiores a 40%, associadas a infecções graves causadas por *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos (Venkateswaran *et al.*, 2023).

Verificou-se resistência a agentes antimicrobianos, incluindo ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, aztreonam, trimetoprim/sulfametoxazol, gentamicina, ácido nalidíxico, tetraciclina, amicacina, imipenem, ofloxacina em isolados de cKP. Já o hvKP apresenta taxas de resistência significativamente mais baixas a todos os agentes antimicrobianos do que o cKP, exceto ao sulfametoxazol-trimetoprima e à ampicilina (Rastegar *et al.*, 2019).

Os modos de resistência aos antibacterianos na *K. pneumoniae* são codificados intrinsecamente ou adquiridos através de mutação e aquisição de genes de resistência. Vários fatores, incluindo a aquisição de determinantes de resistência induzida pelo estresse, funções alteradas da barreira da membrana e promoção da formação de biofilme, podem influenciar a resposta adaptativa de *K. pneumoniae* (Quadro 2) (Ndlovu *et al.*, 2023).

Quadro 2 – Genes de resistência antimicrobiana da *K. pneumoniae*

Genes	Fatores associados à resistência microbiana
Gene de resistência aos aminoglicosídeos	Os aminoglicosídeos, que podem inibir a síntese de proteínas bacterianas. O mecanismo de tolerância cromossômica da KP aos aminoglicosídeos inclui modificação da permeabilidade celular e genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
Gene de resistência às quinolonas	Os antibacterianos quinolônicos têm como alvo as topoisomerasas bacterianas para inibir a replicação do DNA. O mecanismo de resistência de KP à fluoroquinolona inclui principalmente mutação do gene alvo, produção de bomba de efluxo MDR e modificação de enzimas e proteínas de proteção alvo.
Gene de resistência β -lactâmico	Os antibacterianos β -lactâmicos têm sido utilizados clinicamente desde a década de 1940, a resistência à penicilina da KP foi encontrada pela primeira vez na década de 1960, o que também levou à descoberta da primeira classe de genes β -lactamase (blaSHV-1 e blaTEM-1). Vinte anos depois, o primeiro gene blaSHV-2 da β -lactamase de amplo espectro foi identificado em <i>K. pneumoniae</i> . Este gene exibe um amplo espectro de atividades de tolerância a β -lactâmicos (incluindo cefalosporinas e monocosaminas). Logo, outra variante ESBL mediada por plasmídeo, blaTEM-3, foi encontrada em <i>K. pneumoniae</i> na França.
Gene de resistência à polimixina	A polimixina perturba a integridade da membrana pelo deslocamento de íons extracelulares ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) com ligação ao lipopolissacarídeo carregado negativamente (LPS) e causando lise celular.
Gene de resistência à tigeciclina	A tigeciclina é a primeira geração de gliciliciclina [85], que tem sido usada desde 2005 e é usada para tratar a infecção por <i>K. pneumoniae</i> . A tigeciclina é um medicamento promissor com atividade antibacteriana de amplo espectro e é eficaz mesmo para cepas derivadas de ESBL. Os mecanismos conhecidos de tolerância à tigeciclina são codificados cromossomicamente, incluindo modificações dos alvos das unidades ribossômicas 30S e 16S, bem como alterações na permeabilidade celular.

Fonte: Wang *et al.* (2020).

As altas taxas de resistência à 3ª geração de cefalosporinas relatadas para e *K. pneumoniae* significam que o tratamento de infecções suscetíveis de serem causadas por estas bactérias em muitos ambientes devem contar com os carbapenêmicos, o último recurso para tratar doenças graves adquiridas na comunidade e em infecções hospitalares. Estes antibacterianos são mais caros, podem não estar disponíveis, e também são suscetíveis de acelerar ainda mais o

desenvolvimento de resistência (*World Health Organization, 2020*). Todo este contexto aponta para a importância de realização de novos produtos farmacêuticos para o tratamento de infecções causadas pela *K. pneumoniae*, assim como, para lesões na pele.

3.2 Produtos naturais da classe dos Terpenos com potencial antibacteriano

A dispersão mundial de isolados clínicos resistentes levou à necessidade de descobrir novos agentes antimicrobianos, todavia, a resistência precipitada e prevalente aos agentes antimicrobianos recentemente criados sugere que novas famílias também terão uma vida útil curta (*Toombs-Ruane et al., 2020*). Muitas plantas aromáticas e medicinais, ervas e especiarias têm sido propostas como uma fonte significativa de antimicrobianos naturais como uma alternativa aos medicamentos sintéticos para tratar infecções bacterianas (*Puvaca et al., 2020*).

As plantas medicinais e o óleo essencial delas extraído têm sido amplamente utilizados para esse fim devido à alta concentração de compostos bioativos. Comprovadamente os óleos essenciais têm sido usados para tratar doenças infecciosas do trato urinário, doenças respiratórias, distúrbios intestinais e doenças dérmicas (*Puvaca et al., 2021*).

Neste sentido, os compostos naturais de origem vegetal surgem como poderosas ferramentas terapêuticas potenciais, pois, as plantas produzem uma fonte inestimável de metabólitos secundários em resposta a fatores ambientais, como ataque de herbívoros, estresse abiótico ou interações interespecíficas. Atualmente, os mecanismos de ação mais conhecidos e estudados entre os agentes antimicrobianos estão relacionados com uma grande variedade de alvos e processos bacterianos, tais como a inibição da síntese proteica, inibição de vias metabólicas, interferência na síntese da parede celular, inibição de DNA e síntese de ácido ribonucleico (RNA) e lise da membrana bacteriana, entre outros (*Álvarez-Martínez et al., 2021*).

Os fitoquímicos podem atuar através de diferentes mecanismos e locais-alvo em comparação com os antibacterianos tradicionais, portanto, sua combinação com antibacterianos convencionais tem sido proposta para fornecer eficácia superior na supressão do desenvolvimento de resistência (*Abreu; McBain; Simões, 2012*).

Entre os fitoquímicos decorrentes do metabolismo secundário das plantas, os terpenos foram exaustivamente estudados e relatados atividades importantes na saúde humana exercendo atividades antimicrobianas contra bactérias suscetíveis e resistentes a antibacterianos, principalmente através de suas habilidades de promover a ruptura celular e a inibição da síntese de proteínas e DNA (Masyita *et al.*, 2022).

O uso de terpenos como agentes antimicrobianos em cosméticos, alimentos e alguns produtos de saúde, como tônicos capilares, pasta de dente, limpadores de pálpebras, restauradores capilares, sabonetes para a pele e loções corporais já está bem relatado na literatura (El Hachlafi *et al.*, 2021).

O termo terpeno, proposto por Dumas em 1866, tem origem na palavra latina “terebintina” (*Balsamum terebinthinae*), um extrato líquido de pinheiros. Os terpenos são os maiores produtos naturais, com variação estrutural significativa, incluindo hidrocarbonetos lineares ou esqueletos carbocíclicos. A unidade isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero, dimetilalil difosfato (DMAPP), são os precursores da biossíntese dos terpenos. Os terpenos são abundantes em plantas superiores, frutas cítricas, coníferas e eucaliptos e estão amplamente distribuídos nas folhas, flores, caules e raízes dessas plantas. A classificação dos terpenos é baseada nas unidades de isopreno propostas por Wallach em 1887 (C_5H_8), um composto de 5 carbonos que forma a estrutura dos terpenos (Abdallah; Quax, 2017; Ninkuu *et al.*, 2021; Mabou; Yossa, 2021).

Desta forma, os terpenos são agrupados em classes de acordo com o número de unidades de isopreno (n) na molécula: hemiterpenos (C_5H_8), monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), diterpenos ($C_{20}H_{32}$), triterpenos ($C_{30}H_{48}$), tetraterpenos ($C_{40}H_{64}$), e politerpenos (C_5H_8)_n (Ninkuu *et al.*, 2021; Mabou; Yossa, 2021; Masyita *et al.*, 2022).

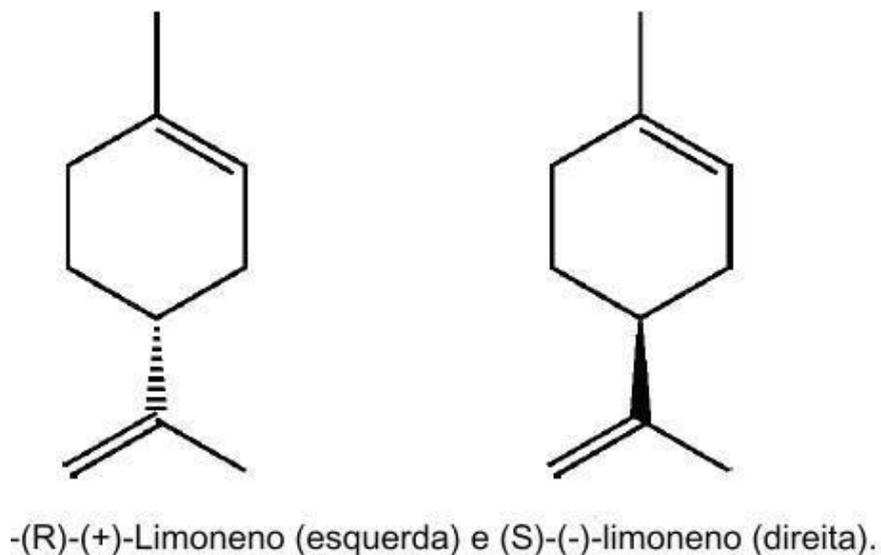
3.2.1 Limoneno: características e aplicabilidade

O limoneno é um monoterpeno, um dos mais comuns na natureza e um dos principais constituintes de vários óleos essenciais de frutas cítricas. Caracteriza-se como um monoterpeno cíclico formado somente por átomos de carbono e hidrogênio, líquido incolor e existe como dois isômeros ópticos e como uma mistura racêmica (Figura 5). Possui um agradável odor de limão, o que o torna amplamente utilizado como aditivo de sabor e fragrância em alimentos comuns, como sucos de

frutas, doces, gomas de mascar, refrigerantes e sorvetes. Por fim, é considerado seguro, apresentando baixa toxicidade para humanos, sem induzir risco mutagênico, carcinogênico ou nefrotóxico aos humanos (Vieira *et al.*, 2018; Kvittingen; Sjursnes; Schmid, 2021).

O limoneno, 4-isoproprenil-1-metil-ciclo-hexeno, fórmula $C_{10}H_{16}$, apresenta um anel ciclohexênico, uma metila, ligação dupla formando o radical isopropenila e carbono quiral. O limoneno apresenta em seu anel ciclo-hexeno um carbono quiral (está ligado a quatro substituintes diferentes entre si). Esta característica faz com que o limoneno exista na forma de dois isômeros ópticos. Os isômeros ópticos são aqueles em que sua imagem no espelho não se sobrepõe à molécula original. Os carbonos quirais são identificados como R ou S. Em outras notações também para isômeros ópticos incluem o uso das letras d (dextrogiro, desvia o plano da luz polarizada para direita) e l (levógiro, desvia o plano da luz polarizada para esquerda), e os símbolos + e -. Assim, podemos chamar um isômero de R-(+)-limoneno e o outro de S-(-)-limoneno (Figura 5). Estes dois enantiômeros do limoneno são os mais abundantes monoterpenos na natureza (Burnham, 2024).

Figura 5 – Estruturas químicas do R-(+)-limoneno e de S-(-)-limoneno, respectivamente.



Fonte: Kvittingen, Sjursnes e Schmid (2021).

A avaliação da atividade biológica dos terpenos, incluindo o limoneno, tem sido realizada ao longo dos anos com o objetivo de identificar novos compostos com atividade antibacteriana (Guimarães *et al.*, 2019). A atividade antibacteriana de óleos

essenciais e componentes isolados de óleos essenciais contendo terpenos (OEs = (-)-Terpinen-4-OL, (-)-B-Pineno, (+)-Carvone, (±)-Cintronellal, 4-Allylanisole, Cinamaldeído, Citral, Eugenol, Geraniol, R-(+)-limoneno, (S)-limoneno e A-Pinene) contra cepas de *Vibrio* foi avaliada. Seguindo ensaio de crescimento bacteriano, comparando o crescimento de *Vibrio* com ou sem OEs em várias concentrações observou-se que o R-(+)-limoneno, (S)-limoneno e cinamaldeído mostraram inibição significativa do crescimento bacteriano de *V. campbellii*, redução de 50% em comparação com o grupo controle (Zheng *et al.*, 2020).

Atividade antibacteriana do óleo essencial de limão (*Citrus aurantifolia*) e limoneno contra as cepas Gram-negativas foram *E. tarda*, *P. damsela*, *V. harveyi* e as cepas Gram-positivas *L. garvieae*, *S. iniae* e *S. parauberis* também foi testada, as atividades antibacterianas do óleo essencial de limão e do limoneno foram consideravelmente eficazes contra essas bactérias patogênicas podendo ser usados como alternativas para tratar infecções bacterianas (Pathirana *et al.*, 2018).

O potencial antimicrobiano do limoneno foi avaliado em muitos estudos contra um amplo espectro de microrganismos patogênicos (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como *Streptococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, estando seu mecanismo de ação associado à presença de determinados compostos que podem alterar a permeabilidade da membrana celular dos microrganismos e/ou inibir enzimas importantes para o seu crescimento e sobrevivência, ou ainda, ao seu comportamento lipofílico capaz de desnaturar proteínas e camadas lipídicas, alterando as propriedades e função da parede celular, e levando à perda de componentes intracelulares e eventual morte celular (Ribeiro *et al.*, 2023).

Além do estudo sobre a ação antibacteriana do limoneno, o mecanismo de ação antibacteriana do limoneno também foi explicado em alguns dos estudos. Uma proteína β -barrel (LptD) é uma proteína essencial da membrana externa presente na montagem do lipopolissacarídeo (LPS), a depleção dessa proteína leva ao aumento da permeabilidade da membrana da célula bacteriana (Gupta; Jeyakumar; Lawrence, 2021a).

Espina *et al.* (2013) investigaram o efeito bactericida do R-(+)-limoneno contra *Escherichia coli*, os resultados da microespectroscopia infravermelha de reflectância total atenuada após o tratamento de células de *E. coli* com limoneno mostraram o dano do LPS e a permeabilidade alterada da membrana externa também foi observada no estudo. Os autores concluíram que o dano do LPS é o mecanismo de

inativação pelo R-(+)-limoneno e os envelopes celulares são o alvo importante do composto.

Estudos que utilizaram nanoemulsões com limoneno também mostraram rompimento completo da estrutura celular levando à lise e liberação de material intracelular tanto em bactérias Gram-positivas quanto em negativas (Zhang *et al.*, 2014; Bei *et al.*, 2015; Zahi; Liang; Yuan, 2015). Entretanto, a eficácia do limoneno, assim como de outros agentes antibacterianos, pode diferir entre bactérias Gram-positivas e negativas (Gupta; Jeyakumar; Lawrence, 2021a).

Importa destacar que a membrana citoplasmática já é apontada como o alvo primário em células bacterianas Gram-positivas, enquanto em bactérias Gram-negativas a membrana externa é o alvo primário para agentes antibacterianos. Além disso, as células Gram-negativas são mais eficientes do que as células bacterianas Gram-positivas na manutenção de sua homeostase de membrana, razão pela qual há uma diferença entre os agentes antibacterianos em relação à atividade bactericida (Li *et al.*, 2016; SANI *et al.*, 2015). Isto se deve ao fato que, a membrana externa de bactérias Gram-negativas, que é composta de moléculas de lipopolissacarídeos, estabelece uma barreira de permeabilidade hidrofílica que protege contra o efeito de drogas altamente hidrofóbicas (Trombetta *et al.*, 2005). Esta relação explicaria a razão da baixa sensibilidade das células bacterianas Gram-negativas aos efeitos letais de monoterpenos lipofílicos como o limoneno (Gupta; Jeyakumar; Lawrence, 2021a).

Outras atividades biológicas do Limoneno são destacadas como: propriedades anticancerígenas, antinociceptivas, gastroprotetoras e cicatrizantes de úlceras gástricas, antioxidantes e anti-inflamatórias, eficácia na melhoria da função pulmonar e efeito neuroprotetor em doenças neurodegenerativas incluindo doença de Alzheimer, esclerose múltipla, epilepsia (Eddin *et al.*, 2021). Ademais, o mesmo é geralmente reconhecido como seguro para consumo humano como uma substância aromatizante sintética. A ingestão diária tolerável (IDT) de Limoneno foi estimada em 0,27 mg/kg de peso corporal, ou seja, para um adulto de 60 kg, a IDT é de 16,2 mg, esta dose provém naturalmente dos alimentos e da sua adição como aromatizante (Soulimani, Bouayed e Joshi, 2019).

3.3 Formas farmacêuticas nanotecnológicas

O uso de antimicrobianos tópicos é benéfico para o controle de infecções no tratamento de feridas porque a infecção da ferida é a principal causa do retardo na cicatrização (Punjataewakupt; Napavichayanun; Aramwit, 2019). A este respeito, infecções de feridas ou locais cirúrgicos estão frequentemente associadas ao fracasso de tratamentos à base de antimicrobianos ou à falta concomitante de novos agentes, além disso, bactérias Gram-negativas, como *Klebsiella pneumoniae* representam uma grande ameaça à saúde humana, uma vez que são as bactérias mais resistentes, de rápida propagação emergindo como superbactérias clinicamente relevantes (Alfei; Schito, 2020). As vantagens dos antimicrobianos tópicos sobre os sistêmicos incluem maior concentração no local alvo, menos efeitos adversos sistêmicos e menor incidência de resistência antimicrobiana (Punjataewakupt; Napavichayanun; Aramwit, 2019).

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico e complexo que afeta a qualidade de vida dos pacientes e acarreta anualmente custos elevados para o sistema de saúde, em todo o mundo (Rahimi *et al.*, 2020). A tecnologia de nanoemulsão surgiu nos últimos anos e está fornecendo resultados muito promissores. Estas, com tamanho de gotícula de até 0,5 µm, são geralmente mais estáveis cineticamente do que emulsões grossas, o que resulta em um aumento na presença do agente antimicrobiano (Garre *et al.*, 2020).

Comprovadamente, os produtos naturais desempenham várias funções biológicas no corpo humano, como anticâncer, anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, entre outros. Contudo, apresentam baixa estabilidade, são altamente sensíveis à oxidação, possuem menor solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e sustentabilidade. Para superar esses obstáculos, que dificultam suas aplicações, várias abordagens foram introduzidas, entre elas, nos últimos anos, a estratégia de encapsulamento tem recebido muita atenção como uma técnica proeminente devido à sua ampla gama de benefícios e aplicações à saúde (Karim *et al.*, 2022).

Segundo Garre *et al.* (2020) as nanoemulsões de óleos essenciais forneceram resultados satisfatórios contra uma ampla variedade de microrganismos e seu efeito antimicrobiano foi ainda mais agudo quando aplicado em uma forma nanoemulsionada. Isto se daria em razão do tamanho menor das gotículas

nanuemulsionadas aumentar a área de superfície que entra em contato com as células bacterianas e promover a interação entre o agente antimicrobiano e a membrana celular do microrganismo.

O encapsulamento é considerado uma abordagem prática, na qual os bioativos são revestidos por materiais na forma de cápsulas ou partículas em escala nanométrica (Wang; Jung; Zhao, 2017). Para Fernandes *et al.* (2021) a nanotecnologia oferece muitas vantagens para a liberação de fármacos, como:

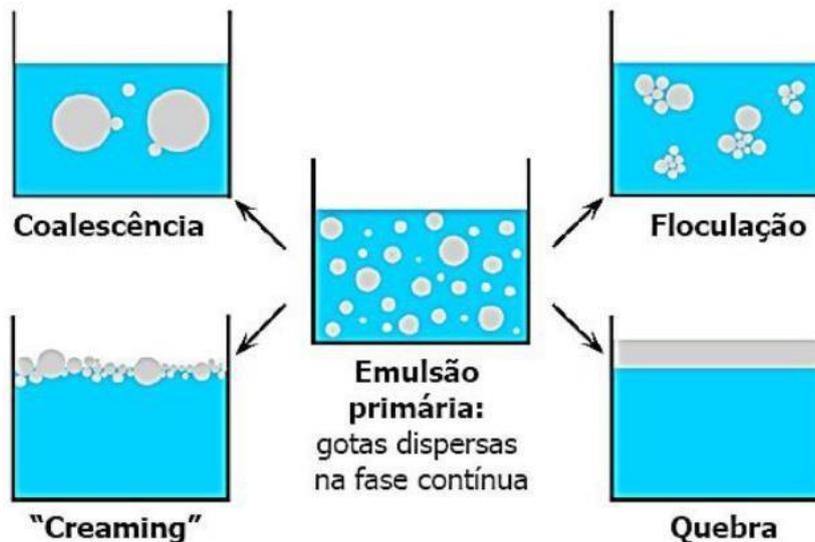
- 1) Possibilidade de modificação de tamanho, forma e superfície que impacta no transporte, acúmulo e reconhecimento de nanopartículas em seus alvos;
- 2) Permitir o encapsulamento de fármacos pouco solúveis em água, com baixa biodisponibilidade;
- 3) Proteção do fármaco contra degradação;
- 4) Permitir terapia combinada, uma vez que o nanocarreador pode carregar fármacos com diferentes atividades terapêuticas, que podem atuar sinergicamente;
- 5) Permitir que o nanossistema atinja o tecido alvo;
- 6) Ser capaz de responder a estímulos endógenos específicos, como potencial hidrogeniônico (pH), ou exógenos, como fototerapia, ultrassom, campo magnético, entre outros, reduzindo a inespecificidade do tratamento;
- 7) Permanecer por mais tempo na corrente sanguínea e, portanto, permitir a liberação sustentada do fármaco nanoencapsulado.

Métodos passivos e ativos de aumento da penetração na pele têm sido usados com sucesso para melhorar a eficiência da administração tópica ou da administração transdérmica. Carreadores de medicamentos nanométricos atraíram muita atenção na última década como opções em formulações para terapia tópica. Nanopartículas (incluindo nanoesferas, nanopartículas lipídicas sólidas, micelas), lipossomas e nanoemulsões estão entre os sistemas mais estudados (Zhang *et al.*, 2013).

Nanoemulsões são misturas isotrópicas heterogêneas de óleo, água e surfactante em que o óleo ou a água formam uma fase dispersa e o outro forma a fase contínua, são estabilizadas pelo potencial do filme interfacial das moléculas do surfactante (Ojha *et al.*, 2021; Algahtani; Ahmad, 2020). Também conhecidas como emulsões de tamanho nanométrico apresentam gotículas $\leq 200\text{nm}$ e são estabilizadas pela adição de emulsificantes (Preeti *et al.*, 2023). Por possuírem

tamanho de partícula nanométrico elas são transparentes ou translúcidas, adicionalmente, devido ao seu menor tamanho de partículas as nanoemulsões são muito mais estáveis contra floculação, coalescência e formação de creme (ou *creaming*) (Figura 6) (Moradi; Barati, 2019).

Figura 6 - Tipos de separação em emulsões.



Fonte: Franzol e Rezende (2015).

Embora as nanoemulsões tenham alta carga de fármaco e capacidade de solubilização, ainda assim a sua entrega transmembranar é lenta devido à sua baixa viscosidade e espalhabilidade. Para resolver este problema, os pesquisadores exploraram a modificação da nanoemulsão em nanoemulgel, adicionando um agente gelificante adequado (Ojha *et al.*, 2021).

Os medicamentos podem ser incorporados em nanoemulgeis que atuam como um sistema de entrega coloidal direcionado que pode melhorar a biodisponibilidade e estabilidade, reduzindo o tamanho geral da formulação. A parte da nanoemulsão deste sistema de entrega protege a porção ativa da degradação enzimática, hidrólise, etc., e a parte do gel fornece estabilidade termodinâmica ao sistema, reduzindo a tensão superficial e interfacial e, assim, aumentando a viscosidade geral e a espalhabilidade (Lal *et al.*, 2023).

O nanoemulgel possui várias vantagens sobre nanopartículas lipídicas, microemulsões ou lipossomas na administração transdérmica devido à sua alta capacidade de carga de medicamento, melhor difusibilidade, permeabilidade e baixa irritação da pele (Kotta *et al.*, 2014).

No processo de desenvolvimento de diversas formulações de importância farmacêutica, o nanoemulgel provou ser um excelente veículo de administração de medicamentos via aplicação transdérmica, dentária, ocular e vaginal para o tratamento de vários tipos de doenças (Setya *et al.*, 2019; Srivastava; Kohli; Ali, 2016).

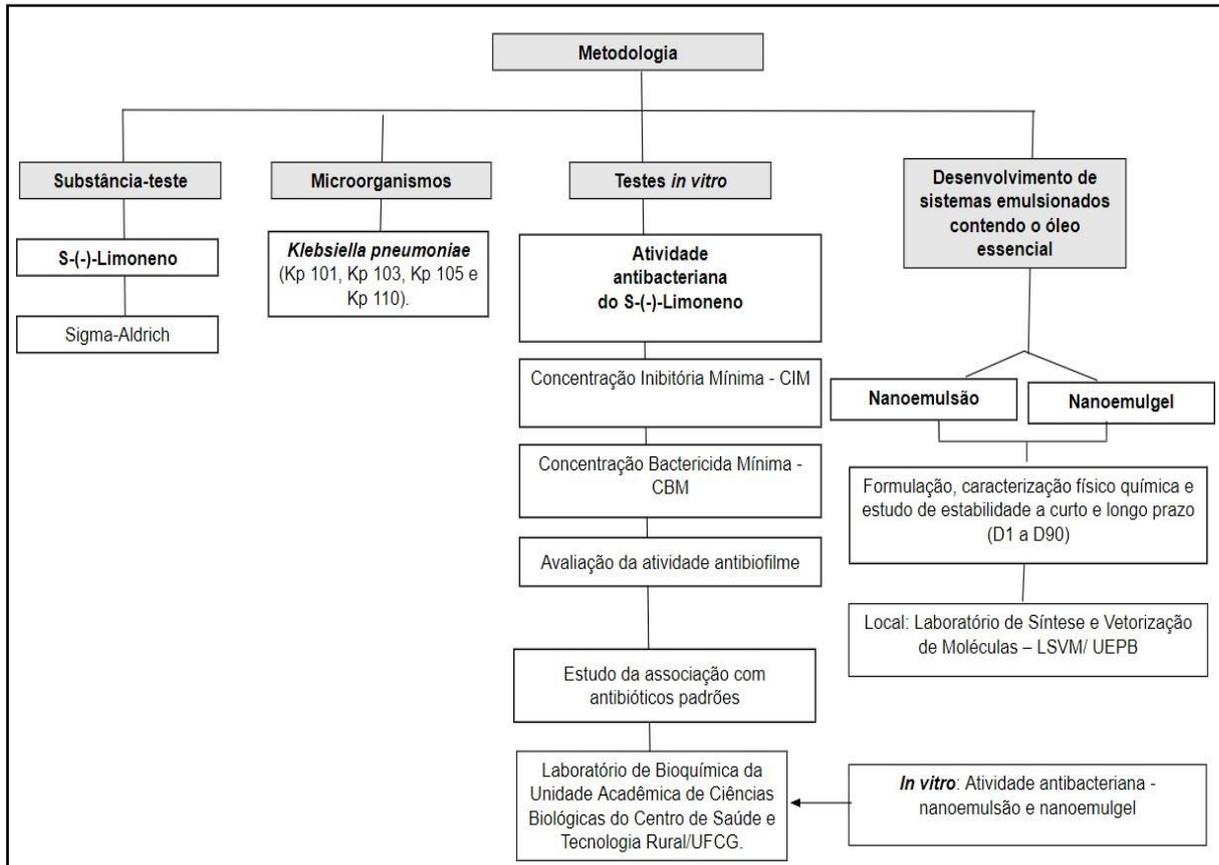
Quando o nanoemulgel é comparado com as formas farmacêuticas mencionadas acima, possui estabilidade relativamente melhorada, melhor penetração, menos oleosidade, facilidade de incorporação de medicamentos hidrofóbicos, alta eficiência de carregamento de medicamentos e melhor eficácia (Shankar *et al.*, 2018; SAH; Badola; Mukhopadhyay, 2017).

Como na maioria dos novos sistemas de liberação de medicamentos, a estabilidade é uma questão principal, onde o nanoemulgel pode ser considerado um ótimo sistema para superar os problemas de instabilidade associados a outros sistemas de distribuição de medicamentos (Ojha *et al.*, 2021).

4 MATERIAL E MÉTODO

A Figura 7 abaixo representa esquematicamente o fluxo metodológico do presente estudo.

Figura 7 – Fluxograma metodológico.



Fonte: Autor (2024).

4.1 Área de estudo e localização de teste experimentais

Realizou-se a pesquisa no Laboratório de Bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas (UACB) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) coordenado pelo Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho e no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) do Centro de Ciências Sociais e Aplicadas da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) – Campus V coordenado pelo Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira.

4.2 Metodologia dos estudos microbiológicos

4.2.1 Micro-organismos e Produto-teste

Utilizaram-se as cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Kp 101, Kp103, Kp104, Kp105 e Kp110) mantidas em meio Ágar Muller Hinton (AMH) a uma temperatura de 4°C. Os inóculos foram obtidos a partir de culturas *overnight* em MH a 37°C e diluídas em solução salina estéril para obter concentração final de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), ajustado pela turvação quando comparado com o tubo 0,5 da escala McFarland (Bona *et al.*, 2014). O S-(-)-limoneno foi adquirido através da Sigma-Aldrich®.

4.2.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram o meio líquido Muller Hinton e o meio sólido Ágar Muller Hinton, adquiridos na Difco® e preparados de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Determinou-se a CIM utilizando a técnica de microdiluição em placa contendo 96 poços com fundo em “U”. Adicionou-se 100µL de caldo Mueller Hinton, duplamente concentrado e 100µL do produto em estudo (S-(-)-Limoneno) em cada poço da placa, nas concentrações de 1024 a 16µg/mL. Conduziu-se a determinação da CIM com 10µL do inóculo previamente preparado e adicionado em cada cavidade. Preparou-se também o controle de crescimento no penúltimo poço, contendo 200µL do caldo e a suspensão de micro-organismo e no último poço foi o controle negativo com apenas 200µL do caldo, sendo realizado todo o ensaio em duplicata. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas, após esse período realizou-se a primeira leitura dos resultados.

Em seguida, adicionou-se 20µL de solução de resazurina sódica (Sigma Aldrich®), em água destilada esterilizada na concentração de 0,01% (p/v), reconhecido como indicador colorimétrico de óxido-redução para bactérias e feita

nova incubação a 37°C. A leitura procedeu-se visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo pela formação de aglomerado de células (botão) e pela observação da mudança da coloração da solução, de azul para rosa, indicando crescimento do micro-organismo.

Determinou-se a CIM como a menor concentração do produto que inibiu o crescimento visível do microrganismo ensaiado, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador (Palomino *et al.*, 2002; Ostrosky *et al.*, 2008, CLSI 2012; Bona *et al.*, 2014).

4.2.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Determinou-se a CBM após a leitura dos resultados da Concentração Inibitória Mínima preparou-se inóculos (10µL) de três diluições a partir da CIM para o meio de caldo Mueller-Hinton (100µL/cavidade) em placa de microdiluição esterilizada, em seguida seguiram para incubação a 37°C por 24 horas, após esse tempo foi adicionado 20µL de resazurina. Os ensaios foram incubados a temperatura de 37°C por mais 24 horas para confirmação da concentração capaz de inibir o crescimento total das espécies bacterianas, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador (Ncube *et al.*, 2008; Guerra *et al.*, 2012).

4.2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA)

A Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do composto foi determinada na presença de sacarose a 5%, de acordo com Albuquerque *et al.* (2010) com modificações, usando-se concentrações correspondentes ao composto até a diluição 1:1024. A partir do crescimento bacteriano, a cepa de bactéria foi cultivada a 37°C em caldo Mueller Hinton (DIFCO®), depois distribuídos 0,9mL do subcultivo em tubos de ensaio e, em seguida, adicionou-se 0,1mL da solução correspondente às diluições do composto.

A incubação foi feita a 37°C por 24 horas com tubos inclinados a 30°. Realizou-se a leitura através da observação visual da aderência da bactéria às paredes do tubo, após a agitação do mesmo. O ensaio foi realizado em duplicata. O mesmo procedimento foi realizado para o controle positivo, o digluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard®, Colgate-Palmolive Company, Nova York, EUA).

Considerou-se a CIMA a menor concentração do agente em contato com sacarose que impediu a aderência ao tubo de vidro.

4.2.6 Estudo de associação do S-(-)-Limoneno com os antibacterianos sintéticos frente a cepas *Klebsiella pneumoniae*

O estudo de associação do produto com os antibacterianos, foi realizado por meio da técnica de difusão em disco em meio sólido utilizando discos de papel filtro (Bauer *et al.*, 1966). Uma alíquota de 20µL da CIM do produto teste foi transferida para os discos contendo os antibacterianos nas suas respectivas concentrações, sendo em seguida alocados em placas de Petri estéreis lisa (140x15) contendo o meio AMH que, previamente foram inoculados com *swabs* estéreis, um volume aproximadamente de 1mL das suspensões bacterianas.

Posteriormente, as placas foram incubadas a 35°C por 24-48h, seguido da realização de sua leitura. Considerou-se como efeito sinérgico, quando da ocorrência de halo de inibição do crescimento microbiano formado pela aplicação combinada do composto mais o antibacteriano (AB) com diâmetro \geq que 2mm, quando comparado com o halo de inibição formado pela ação do AB isoladamente. Quando a combinação do produto com o antibacteriano resultou em um halo de inibição com um diâmetro menor do que o obtido pelo antibacteriano isolado, considerou-se efeito antagônico. Foi considerado como efeito indiferente, quando a formação do halo de inibição resultante da combinação, obteve o mesmo diâmetro do antibacteriano quando avaliado individualmente (Cleeland; Squires, 1991; Oliveira *et al.*, 2006). Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados a serem expostos foram obtidos através da média dos resultados dos dois ensaios paralelos.

4.3 Metodologia para o desenvolvimento e caracterização dos sistemas emulsionados incorporados com o S-(-)-Limoneno

4.3.1 Materiais

Adquiriu-se o S-(-)-Limoneno na Sigma-Aldrich®, Álcool metílico (CRC Produtos Químicos, São Paulo), Polissorbato 80 (Tween 80®), Monooleato de

sorbitano (Span® 80) e Carbopol também foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O Propilenoglicol (USP – Ely Martins, São Paulo). A água ultrapura foi obtida usando um sistema de osmose reversa (modelo OS50 LX, Gehaka Ins. Ltda, Brasil). Os demais reagentes e produtos utilizados eram de grau analítico.

4.3.2 Teste de Identificação do Equilíbrio Hidrofílico-lipofílico (EHL) do S-(-)-Limoneno

Para a determinação do EHL do óleo foi utilizado o método descrito por Griffin (1949), que consiste em relacionar as massas dos tensoativos Span® 80 e Tween® 80 com seus respectivos valores de EHL (4,3 e 15) em diferentes proporções, de modo a originar valores definidos e escalonados de EHL. As proporções dos tensoativos foram calculados para valores de EHL entre 09 a 15. As nanoemulsões óleo/água (O/A) foram formuladas com 5% (p/p) de óleo, 5% (p/p) de tensoativos (Span® 80 + Tween® 80) e 90% (p/p) de água ultrapura.

As formulações de cada EHL foram submetidas a ultrasonicação em banho de gelo em Sonicador Eco-sonics modelo QR550 (potência de 550W e frequência de 20kHz) com 30% da potência por 2 minutos. Após este procedimento se realizou a leitura do tamanho da gotícula formada e índice de polidispersão (PDI) por espalhamento dinâmico de luz usando um equipamento *Zetasizer Ultra red* (Malvern Ins. Ltd, Reino Unido). Considerou-se partículas com tamanho $\leq 200\text{nm}$ e o PDI $\leq 0,3$. Este último parâmetro sugere a homogeneidade do sistema quanto menor o valor obtido, preferencialmente $\leq 0,3$, maior o grau de homogeneidade da amostra (Preeti *et al.*, 2023). Diluiu-se as amostras na proporção 1:10 (v/v) em água ultrapura.

4.3.3 Otimização dos parâmetros de formulação

Objetivando-se encontrar as melhores condições para obtenção de nanoemulsões de S-(-)-Limoneno estáveis, 17 formulações de 1mL de nanoemulsões O/A foram produzidas, variando-se a concentração de S-(-)-Limoneno (5 a 15%), de tensoativo (mistura de Twen 80 + Span 80 – 3% a 15%) e água ultrapura de acordo com a Tabela 4. Fixou-se o tempo de homogeneização na ultrasonicação em banho de gelo em Sonicador Eco-sonics modelo QR550 (potência

de 550W e frequência de 20kHz) com 30% da potência por 2 minutos. As nanoemulsões obtidas neste estudo foram analisadas 24h após o preparo quanto a seu tamanho médio de gotícula e PDI por espalhamento dinâmico de luz usando um equipamento *Zetasizer Ultra Red* (Malvern Ins. Ltd, Reino Unido). As amostras foram diluídas na proporção 1:10 (v/v) em água ultrapura e realizadas três leituras por amostra. A formulação com menor tamanho de gotícula e menor PDI foi escolhida para continuidade dos estudos.

4.3.4 Produção e nanoemulgeis incorporados com o S-(-)-Limoneno

Preparou-se os nanoemulgeis após 24h da formulação da NEs com os melhores parâmetros de estabilidade apresentados no estudo pela adição de 1% Carbopol nas NEs contendo S-(-)-limoneno e agente gelificante (AMP/TIPA 85%) sob homogeneização em vórtex por 3 min. Os nanoemulgeis foram armazenados em frascos de vidro hermeticamente fechados e acondicionados em ambiente refrigerado ($5\pm 2^{\circ}\text{C}$).

4.3.5 Caracterização das nanoemulsões e nanoemulgeis incorporados com o S-(-)-Limoneno

Avaliou-se as formulações quanto ao tamanho médio de gotícula, PDI, pH e aspectos macroscópicos. O tamanho médio das gotículas e o PDI das formulações (nanoemulsões e nanoemulgeis) foram avaliados por espalhamento dinâmico de luz. As amostras de nanoemulsão foram diluídas 1:10 (v/v) em água ultrapura e as de nanoemulgel em 1:20 (v/v) e analisadas a 25°C com ângulo de detecção de 173° e comprimento de onda de 633nm. As leituras foram realizadas nos dias 0, 1, 20, 30, 60 e 90, respectivamente, D0, D1, D20, D30, D60 e D90.

Para avaliação macroscópica foram analisadas as características de aspecto, cor e homogeneidade com o intuito de observar alterações na aparência por instabilidade. As amostras foram analisadas, identificando qualquer instabilidade, alteração da cor ou separação de fases (Montagner; Correia, 2004). Para análise dos resultados, foram utilizados critérios apresentados no Quadro 3, adaptado por Bühler e Ferreira (2008).

Quadro 3 - Parâmetros para Avaliação das Características Macroscópicas.

Parâmetros	Descrição
N	Normal
LMA	Leve Modificação na Aparência
LMC	Leve Modificação na Cor
LMO	Leve Modificação do Odor
MA	Moderada Modificação na Aparência
MC	Moderada Modificação na Cor
MO	Moderada Modificação do Odor
IMA	Intensa Modificação na Aparência
IMC	Intensa Modificação na Cor
IMO	Intensa Modificação do Odor

Fonte: Bühler e Ferreira (2008).

As medições pH foram realizadas utilizando um pHmetro digital Nova Instruments® (modelo NI PHM, São Paulo, Brasil), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a temperatura de 25°C.

4.4 Atividade antibacteriana da nanoemulsão e do nanoemulgel incorporado com o S-(-)-Limoneno

Realizou-se o teste microbiológico com o intuito de determinar se a nanoemulsão e nanoemulgel contendo com o S-(-)-Limoneno incorporado é capaz de inibir o crescimento da bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Sendo assim, foram utilizadas as mesmas cepas dos testes realizados inicialmente. Para a avaliação da atividade antimicrobiana da nanoemulsão foi realizada a técnica de microdiluição em placa para verificação da CIM e CBM conforme metodologia descrita anteriormente com as cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Kp 101, Kp103, Kp104, Kp105 e Kp110) (itens 4.2.3 e 4.2.4) (Palomino *et al.*, 2002; Ostrosky *et al.*, 2008, CLSI 2012; Bona *et al.*, 2014; Ncube *et al.*, 2008; Guerra *et al.*, 2012). Para realização dos testes biológicos de atividade antibacteriana, as nanoemulsões foram preparadas 24h antes da realização do ensaio.

Para o nanoemulgel a verificação da atividade antimicrobiana se utilizou o método de difusão por poço, ou seja, foram realizados orifícios de 6mm de diâmetro no meio de cultura ágar Mueller-Hinton em placas de Petri, formando assim os poços. Neste ensaio foram utilizadas a cepa Kp110 de *Klebsiella pneumoniae*. As placas foram inoculadas na superfície pelos micro-organismos e os poços foram preenchidos com 20µL do gel na concentração a ser testada. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Os halos de inibição do crescimento microbiano

foram medidos em milímetros, com auxílio de uma régua milimetrada (Bona, 2014; Sumantri *et al*, 2021). Para o teste de difusão em disco considerou-se como atividade inibitória os halos com diâmetro ≥ 6 mm (Bona, 2014).

4.5 Análise estatística

Os dados da pesquisa serão descritos qualitativamente e quantitativamente com medidas de tendência central e dispersão, assim como, a apresentação dos mesmos em gráficos e tabelas utilizando o software de análise estatística SPSS versão 21.0.

5 RESULTADOS

5.1 Estudos da atividade antibacteriana do S-(-)-limoneno contra *Klebsiella pneumoniae*

Investigou-se na presente pesquisa a CIM do S-(-)-Limoneno contra cinco cepas de *K. pneumoniae* (Kp 101, Kp103, Kp104, Kp105 e Kp110) pela técnica da microdiluição em placa de 96 poços sendo considerada a CIM a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento bacteriano (Tabela 1). Em seguida avaliou-se a CBM do produto a fim de observar o potencial bactericida ou bacteriostático do S-(-)-Limoneno (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores obtidos da CIM e CBM do S-(-)-Limoneno contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Cepas bacterianas	CIM	CBM
Kp 101	1000µg/mL	>1000µg/mL
Kp 103	1000µg/mL	>1000µg/mL
Kp 104	1000µg/mL	>1000µg/mL
Kp 105	1000µg/mL	>1000µg/mL
Kp 110	67,5 µg/mL	>1000µg/mL

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). **Legenda:** Kp = *Klebsiella pneumoniae*; CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima.

Com base nos resultados, sendo a CIM a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento bacteriano, observa-se a Concentração Inibitória Mínima 50 (CIM₅₀) de 1000µg/mL. Em seguida avaliou-se a CBM do produto para observar potencial bactericida ou bacteriostático observando-se acima de 1000µg/mL para todas as cepas testadas.

Para determinação da CIMA realizaram-se os ensaios com a cepa que apresentou menor CIM para S-(-)-Limoneno (Kp 110). Sucedeu-se com o mesmo procedimento para o controle positivo usando o digluconato de clorexidina a 0,12%, observando-se que ambas as substâncias não impediram a aderência ao tubo de vidro.

Para o estudo de associação do S-(-)-Limoneno com antibacterianos sintéticos utilizou-se a técnica de difusão em disco em meio sólido utilizando discos de papel filtro e considerou-se como efeito sinérgico quando o halo de inibição do crescimento microbiano formado pela aplicação combinada do composto mais o

antibacteriano apresentou diâmetro \geq que 2mm (Cleeland; Squires, 1991; Oliveira *et al.*, 2006), resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Avaliação da associação do S-(-)-limoneno com os antibacterianos sintéticos frente a cepas *Klebsiella pneumoniae*

Cepa	Substância	AMP	GEN	CEF	CIP
Kp 101	Controle	0mm	20 mm	26 mm	24 mm
	S-(-)-limoneno	24 mm ↑	16 mm ↓	16 mm ↓	24 mm *
Kp 103	Controle	0 mm	18 mm	26 mm	12 mm
	S-(-)-limoneno	0 mm *	20 mm ↓	32 mm ↑	0 mm ↓
Kp 104	Controle	10 mm	16 mm	12 mm	28 mm
	S-(-)-limoneno	6 mm ↓	20 mm ↑	10 mm ↓	36 mm ↑
Kp 105	Controle	12 mm	20 mm	24 mm	36 mm
	S-(-)-limoneno	6 mm ↓	28 mm ↑	40 mm ↑	10 mm ↓
Kp 110	Controle	20 mm	20 mm	28 mm	30 mm
	S-(-)-limoneno	0 mm ↓	32 mm ↑	12 mm ↓	24 mm ↓

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). **Legenda:** AMP = ampicilina; GEN = gentamicina; CEF = ceftriaxona; CIP = ciprofloxacino; ↑ = sinérgico; ↓ = antagônico; * = indiferente.

Ao analisar os dados da associação do S-(-)-Limoneno com os antimicrobianos sintéticos observou-se efeitos sinérgicos, indiferentes e antagônicos. Destaca-se a associação com a gentamicina que apresentou efeito sinérgico com a maior parte das cepas.

5.2 Desenvolvimento e caracterização dos sistemas emulsionados incorporado com o S-(-)-Limoneno

Nesse estudo, foram desenvolvidas nanoemulsões (NEs) para auxiliar na aplicação do S-(-)-Limoneno no tratamento de infecções em lesões de pele causadas pela *K. pneumoniae*. A relação entre o tamanho das gotículas das emulsões e os valores de EHL é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3 – Tamanho médio da gotícula e PDI em diferentes valores de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de 09 a 15 das nanoemulsões contendo S-(-)-Limoneno

Componente/ EHL	09	10	11	12	13	14	15
Tween80®	21,95µg	26,65µg	31,5µg	37µg	41,5µg	45µg	50µg
Span80®	28,95µg	23,55µg	18,5µg	13µg	8,5 µg	4,5 µg	-
S-(-)-Limoneno	50µg	50µg	50µg	50µg	50µg	50µg	50µg
Água ultrapura	900µl	900µl	900µl	900µl	900µl	900µl	900µl
Tamanho médio da gotícula	470nm	212nm	130nm	189nm	307nm	140nm	264nm
PDI	0,4058	0,2700	0,2500	0,4667	0,6307	0,3801	0,6436
Aparência	LT	LT	TL	TL	TL	TL	TL

Fonte: Dados da pesquisa (2023). **Legenda:** PDI = Índice de polidispersão. LT = leitosa. TL = translúcida.

Os resultados mostram que o tamanho médio das gotículas das nanoemulsões pode ser afetado pelos valores de EHL. Onde a formulação com EHL 11 apresentou o menor tamanho médio de gotícula (130nm) e o menor PDI (0,25).

Após a identificação do EHL ideal procedeu-se com a otimização dos parâmetros de formulação das nanoemulsões O/A de 1ml contendo o S-(-)-Limoneno. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Otimização dos parâmetros de formulação, tamanho de gotícula e PDI.

Formulação	S-(-)-Limoneno (%)	EHL - tensoativos (%)	Água ultrapura (%)	Tamanho de gotícula	PDI
1	15%	5%	80%	349,9	0,8444
2	6%	6%	88%	402,6	0,8526
3	11%	10%	79%	174,4	0,3044
4	14%	14%	72%	190,4	0,3289
5	11%	10%	79%	136,4	0,2621
6	11%	15%	74%	112	0,2795
7	14%	14%	72%	194,4	0,3084
8	10%	7%	83%	274,4	0,3555
9	5%	13%	82%	58,72	0,2960
10	7%	15%	78%	55,72	0,2960
11	10%	10%	80%	156,5	0,2351
12	5%	3%	92%	135	0,4142
13	10%	3%	87%	190	0,31,23
14	10%	3%	87%	184,7	0,3309
15	5%	10%	85%	52,88	0,3524
16	15%	5%	80%	129,8	0,2853
17	15%	9%	76%	185,8	0,3983

Fonte: Dados da pesquisa (2023). **Legenda:** EHL = Equilíbrio hidrofílico-lipofílico; PDI = Índice de polidispersão.

Observa-se na Tabela 4 que a Formulação 11 contendo 10% de S-(-)-Limoneno (p/p), 10% de tensoativos (p/p) e 80% de água ultrapura (p/p) apresentou um tamanho de gotícula inferior a 200nm (156,5nm) e o menor PDI (0,2351) entre todas as formulações. Este último parâmetro avalia o grau de uniformidade da distribuição do tamanho das gotículas dentro do sistema (Danaei *et al.*, 2018). Valores de PDI mais próximos de zero indicam uma distribuição monodispersa (Mohd Narawi *et al.*, 2020).

A Formulação 11 (NEL) foi acompanhada durante 90 dias em ambiente refrigerado ($5 \pm 2^\circ\text{C}$). Durante um período de 90 dias análises por espalhamento dinâmico de luz do PDI e tamanho médio das gotículas, assim como, das características macroscópicas e pH foram realizadas, resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Tamanho da partícula, PDI e características macroscópicas da nanoemulsão contendo 10% S-(-)-Limoneno (NEL).

Dias	Tamanho da gotícula	PDI	pH	Características macroscópicas
D1	101,7	0,2728	5	Normal
D20	81,29	0,3631	4,5	Normal
D30	94,13	0,4439	4	Normal
D60	153,7	0,4319	3,5	Moderada Modificação na Aparência
D90	807,7	0,864	3,5	Intensa Modificação na Aparência
Média	225,17	0,4655	--	--
Desvio Padrão	$\pm 286,44$	$\pm 0,2050$	--	--

Fonte: Dados da pesquisa (2023). **Legenda:** EHL = Equilíbrio hidrofílico-lipofílico; pH = potencial hidrogeniônico.

O tamanho médio da gotícula apresentou pequenas variações nos primeiros 30 dias com maior proporção a partir do D60 (tamanho da gotícula = 153,7nm e PDI = 0,4319). Foram observadas também alterações nas características macroscópicas a partir desse dia com formação de floculação e no pH com tendência a apresentar-se mais ácido, sugerindo que o sistema apresenta uma estabilidade de 30 dias.

O nanoemulgel (NGL) foi preparado após 24h da formulação da NEL e os resultados de tamanho médio da gotícula e PDI ao longo de 90 dias são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Tamanho da gotícula, PDI, pH e características macroscópicas do nanoemulgel contendo 10% S(-)-Limoneno (NGL).

Dias	Tamanho da gotícula	PDI	pH	Características macroscópicas
D0	125,7	0,4385	5	Normal
D20	239,9	0,3468	4,5	Normal
D30	434,8	0,5227	4	Normal
D60	548	0,7713	3,5	Moderada Modificação na Aparência
D90	465,9	0,6184	3	Intensa Modificação na Aparência
Média	323,36	0,5217	--	--
Desvio Padrão	±183,42	±0,1529	--	--

Fonte: Dados da pesquisa (2023). **Legenda:** EHL = Equilíbrio hidrofílico-lipofílico; pH = potencial hidrogeniônico

Observa-se que o tamanho médio das gotículas de NGL tenderam ao aumento ao longo do estudo de estabilidade. Observaram-se também alterações nas características macroscópicas a partir desse dia com moderada modificação na aparência pela formação de floculação e no pH com tendência a apresentar-se mais ácido.

Para maior estabilidade das NEs e NGs a longo prazo adicionou-se à formulação propilenoglicol na proporção de 5% mantendo-se as proporções dos tensoativos (EHL 11) e do S(-)-Limoneno, ajustando a proporção de água ultrapura. Desta forma, a nova formulação (NEG) compôs-se de 10% de tensoativos, 10% de S(-)-Limoneno, 5% de propilenoglicol e 75% de água ultrapura. Formulada seguindo a mesma metodologia, resultados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Tamanho da gotícula, PDI, pH e características macroscópicas das NEs com propilenoglicol (NEG).

NEG	D1	D20	D30	D60	D90	Média ± Desvio Padrão
Tamanho da gotícula	47,47	49,93	72,38	44,08	45,52	51,87±11,67
PDI	0,2561	0,3509	0,4192	0,3600	0,3816	0,3535 ±0,0605
pH	5	4,5	4,5	4	4	-
Características macroscópicas	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	-

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). **Legenda:** EHL = Equilíbrio hidrofílico-lipofílico; pH = potencial hidrogeniônico

Analisando a Tabela 7 observa-se que a nanoemulsão com 5% de propilenoglicol (NEG) apresentou um tamanho de gotícula médio 51,87nm (±11,67) e permaneceu mais estável com PDI 0,3535±0,0605. Ao final dos 90 dias de acompanhamento a NEG não apresentou alterações nas suas características

macroscópicas e pH. Prosseguiu-se os experimentos com a NEG para formulação do nanoemulgel (NGG) e ensaios microbiológicos.

Em seguida a estes experimentos e resultados, preparou-se o nanoemulgel (NGG) a partir da NEG (10% de tensoativos, 10% de S(-)-Limoneno, 5% de propilenoglicol e 75% de água ultrapura) após 24h da formulação da mesma seguindo o protocolo descrito anteriormente (Tabela 8).

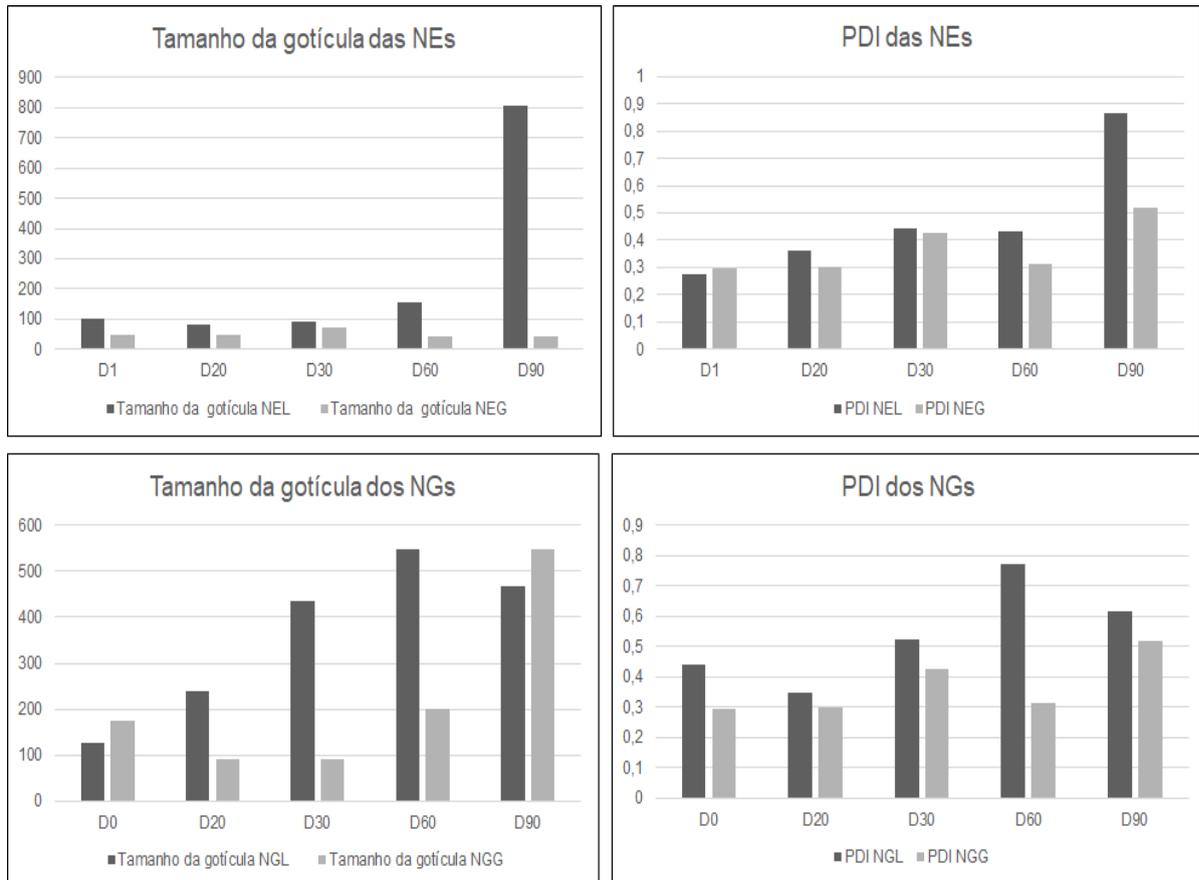
Tabela 8 – Tamanho da gotícula, PDI, pH e características macroscópicas do nanoemulgel com propilenoglicol (NGG)

NGG	D0	D20	D30	D60	D90
Tamanho de gotícula	176	90,09	92,39	201,1	547,9
PDI	0,2946	0,3016	0,4247	0,3155	0,5172
pH	5	4,5	4,5	4	4
Características macroscópicas	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). **Legenda:** EHL = Equilíbrio hidrofílico-lipofílico; pH = potencial hidrogeniônico.

O NGG apresentou variação no tamanho médio da gotícula e PDI durante o estudo de estabilidade, assim como o NG sem o propilenoglicol (NGL - Tabela 6), entretanto, manteve-se estável pelo período de 60 dias (tamanho da gotícula = 201,1nm). Na Figura 8 pode-se comparar os valores do tamanho da partícula formada e PDI das formulações com e sem o propilenoglicol (NEL, NGL, NEG e NGG).

Figura 8 - Tamanho da gotícula e PDI das NEs e NGs com e sem propilenoglicol (NEL, NGL, NEG e NGG).



Fonte: Dados da pesquisa (2023). **Legenda:** PDI = Índice de Polidispersão; NE = Nanoemulsão; NG = nanoemulgel.

Observa-se no comportamento das formulações durante estudo de estabilidade que os NGs tendem ao aumento das variáveis apresentadas, mas o NGG ainda apresenta menores valores de tamanho da gotícula e PDI. Sendo assim, as formulações NEG e NGG apresentaram-se com maior estabilidade durante o acompanhamento quando comparadas às formulações sem o propilenoglicol, incluindo o pH que se manteve dentro da faixa aceitável para o uso na pele, entre 4 e 7 (Lal *et al.*, 2023).

De acordo com Setya, Talegaonkar; Razdan (2014) em muitas situações, apenas um surfactante pode não ser capaz de reduzir a tensão interfacial óleo/água suficientemente para preparar uma nanoemulsão, surge então, a necessidade de se utilizar os co-surfactantes. Estes também são de natureza anfífilica, com tendência a particionar em grande quantidade na monocamada interfacial do surfactante, reduzindo a tensão interfacial, aumentando a fluidez da interface e a entropia do sistema.

Além dos co-surfactantes reduzirem adicionalmente a tensão interfacial, necessária para a formação e estabilidade termodinâmica das nanoemulsões, também promovem a fluidificação do filme interfacial formado pelo surfactante impedindo a elevação significativa da viscosidade do sistema (SILVA *et al.*, 2015).

5.3. Atividade antibacteriana da nanoemulsão e do nanoemulgel incorporados com o S-(-)-Limoneno

Seguindo com os ensaios, realizou-se a investigação da CIM e CBM da nanoemulsão incorporada com o S-(-)-Limoneno, resultados disponíveis na Tabela 9. Observa-se a CIM₅₀ de 1000µg/mL assim como no produto isolado.

Tabela 9 – Valores obtidos da CIM e CBM da Nanoemulsão com 10% de S-(-)-Limoneno contra cepas de *Klebsiela pneumoniae*.

Cepas bacterianas	CIM	CBM
Kp 101	1000µg/mL	>1000µg/mL
Kp 103	1000µg/mL	>1000µg/mL
Kp 104	1000µg/mL	>1000µg/mL
Kp 105	1000µg/mL	>1000µg/mL
Kp 110	128µg/mL	>1000µg/mL

Fonte: Dados da Pesquisa (2023). **Legenda:** Kp = *Klebsiela pneumoniae*; CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima.

Ao se realizar o teste de susceptibilidade das cepas de *K. pneumoniae* ao NG incorporado com S-(-)-Limoneno utilizou-se a cepa Kp110 e observou-se um efeito antibacteriano tendo em vista a formação de um halo de inibição de 20mm.

6 DISCUSSÃO

Posto isto, a seguir serão discutidos os resultados apresentados anteriormente obtidos nesta pesquisa que avalia o potencial antibacteriano do S-(-)-Limoneno isolado e incorporado na nanoemulsão e nanoemulgel contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae*. O tratamento de doenças infecciosas está tornando-se desafiador para os profissionais de saúde devido a uma proporção alarmante de resistência aos antibacterianos em todo o mundo. Por esse motivo, os produtos naturais têm sido estudados como fonte de novas moléculas farmacológicas com potencial antimicrobiano. A abordagem terapêutica alternativa do antigo conhecimento fitoterápico para explorar metabólitos secundários de plantas como potenciais agentes antimicrobianos poderia ajudar na preparação de novos medicamentos (Silva *et al.*, 2023; Gupta, Jeyakumar, Lawrence, 2021b).

Com a realização da pesquisa observou-se que o S-(-)-Limoneno apresentou uma CIM de 1000µg/mL para a maioria das cepas testadas. De modo geral, a CIM₅₀ permaneceu 1000µg/mL. Segundo Sartoratto *et al.* (2004) a atividade antimicrobiana de um composto é forte quando os valores de CIM são até 500µg/mL atividade moderada entre 600–1500µg/mL e atividade fraca acima de 1500µg/mL, desta forma, o S-(-)-Limoneno apresenta um moderado efeito antibacteriano contra as cepas de *K. pneumoniae*.

No tocante à CBM, para todas as cepas testadas observou-se valores >1000µg/mL. Para Hafidh *et al.* (2011), o composto é considerado bactericida quando essa proporção CIM:CBM está entre 1:1 a 2:1, e bacteriostático quando esta proporção é maior que 2:1. Sendo assim, o S-(-)-Limoneno apresenta atividade bacteriostática contra as cepas testadas.

Os resultados encontrados corroboram com o estudo de Silva *et al.* (2021), onde analisou-se a atividade antibacteriana dos fitoquímicos S-(-)-Limoneno e R-(+)-Limoneno contra as bactérias isoladas *Aeromas hydrophila* (ATCC 7966, MF 372509, MF 372510), *Aeromas Veronii* (MH 397688), *Citrobacter freundii* (MF 565839), *Raoutella ornithinolytica* (MF 372511) e *Stenotrophomonas maltophilia* (MT 572493) de bagre prateado (*Rhamdia quelen*). Assim como, a terapia combinada dos fitoquímicos com antimicrobianos e sua atividade em termos de inibição da formação de biofilme em placas de 96 poços e cubos de náilon. Entre as cepas

testadas (padrão e isolados clínicos) a mais sensível foi a *A. hydrophila* (MF 372510).

S-(-)-Limoneno e R-(+)-Limoneno apresentaram concentrações inibitórias mínimas elevadas, $3,2\text{mg/mL}^{-1}$ e $6,42\text{mg/mL}^{-1}$, respectivamente. O S-(-)-Limoneno e R-(+)-Limoneno também inibiram fortemente a formação de biofilme de *A. hydrophila*. Os mesmos tiveram efeito sinérgico quando combinados com florfenicol e efeito antagônico com oxitetraciclina. Em geral, os fitoquímicos testados apresentaram forte atividade antibiofilme contra *A. hydrophila* e, quando em terapia combinada com florfenicol, apresentaram efeito aditivo contra o tratamento desta cepa (Silva *et al.*, 2021).

O limoneno é um dos fitocompostos que possui importante propriedade antibiofilme, sendo investigada e comprovada em vários estudos realizados por muitos pesquisadores (Gupta; Jeyakumar; Lawrence, 2021b). A propriedade anti-biofilme do limoneno foi observada inibição significativa do biofilme de *B. cereus*, *E. coli* e *P. anomala*. Além disso, cerca de 75-95% de inibição do biofilme foi observada contra *S. pyogenes* e *S. mutans* na concentração de $400\mu\text{g/mL}$ (Subramenium; Vijayakumar; Pandian, 2015). Observou-se também que o limoneno reduz a produção de biofilme em até 90% após 8h de incubação na concentração de $2.000\mu\text{g/mL}$ em diferentes cepas de *S. aureus*, assim como, também foi observada inibição efetiva do biofilme pelo contra *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* (Espina *et al.*, 2015; Nosrati *et al.*, 2018; Permezovic *et al.*, 2016).

No estudo de Costa *et al.* (2019) objetivou-se avaliar a atividade antibacteriana do d-limoneno, isolado e complexado com β -ciclodextrina, e avaliar sua atividade potencializadora de diferentes classes de antibacterianos. A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, obtendo-se desta forma a Concentração Inibitória Mínima, sendo a atividade moduladora do antibacteriano obtida utilizando uma concentração sub-inibitória (CIM/8). Dentre os resultados observou-se que o d-limoneno apresentou CIM igual a $256\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus* padrão e $512\mu\text{g/mL}$ contra *P. aeruginosa* resistente.

Sreepian *et al.* (2022) realizaram estudo com os objetivos de determinar as composições químicas e avaliar as atividades antibacterianas de óleos essenciais cítricos extraídos das cascas dos frutos de *C. reticulata* e *C. aurantifolia*, isoladamente e em combinação com gentamicina, contra um painel de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) clinicamente isolado e *S. aureus* suscetível à

metecilina. A análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massa revelou que 12 e 25 compostos foram identificados em *C. reticulata* e *C. aurantifolia* com o composto mais predominante de limoneno (62,9–72,5%).

As atividades antibacterianas foram determinadas por difusão em disco de ágar e métodos de microdiluição à base de resazurina, os resultados mostraram que quase todos os isolados de MRSA eram resistentes à ciprofloxacina, eritromicina e clindamicina, e alguns isolados foram resistentes à gentamicina. *C. reticulata* e *C. aurantifolia* exibiram efeitos inibitórios em relação aos isolados clínicos (CIM: 1,0–32,0 e 8,0–32,0mg/mL, respectivamente), com tendência semelhante ao limoneno (CIM: 1,0–32,0mg/mL). Entretanto, os autores relatam que os maiores efeitos antibacterianos foram encontrados no *C. reticulata* e no limoneno quando comparados ao *C. aurantifolia* ($p < 0,01$). Em efeito combinado, os resultados mostraram a interação sinérgica da gentamicina com *C. reticulata* e limoneno nos isolados de MRSA (Sreepian *et al.*, 2022).

No estudo desenvolvido por Han, Chen e Sun (2021) objetivou-se investigar o efeito antibacteriano e o mecanismo do limoneno contra *S. aureus*, mostrou-se que o limoneno inibiu eficazmente o crescimento bacteriano a uma concentração inibitória mínima de 20mg/mL. A microscopia eletrônica de varredura e a observação do microscópio de fluorescência confirmaram que o limoneno causou a destruição da morfologia celular e da integridade da parede celular de *S. aureus*.

Dias *et al.* (2022) realizaram estudo para determinar as atividades antibacterianas de três óleos essenciais (*Psidium Cattleianum* Sabine, *Cryptocarya aschersoniana* Mez. e folhas de *Ocotea dispersa* Nees (Mez.)) e seus principais constituintes contra bactérias patogênicas de origem alimentar e deteriorantes de alimentos *Bacillus cereus* (ATCC 10987), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Brochothrix thermosphacta* (ATCC 11509), *Clostridium botulinum* (ATCC 19397) e *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17397). Os mesmos apresentaram forte atividade antibacteriana, uma vez que seus valores de CIM e CBM variaram entre 20 e 250µg/mL e esta forte atividade antibacteriana deve-se aos seus principais constituintes: o viridiflorol, limoneno e α -eudesmol. Ao realizar ensaio para avaliar CIM e CBM dos constituintes isolados, o limoneno obteve forte atividade antibacteriana e bactericida com CIM e CBM variando entre 20-50µg/mL contra todas as cepas testadas.

Nesta pesquisa, o S-(-)-Limoneno não apresentou atividade antibiofilme contra as cepas de *K. pneumoniae* testadas, incluindo o controle positivo com o digluconato de clorexidina a 0,12%. Tais resultados corroboram com os de Diniz *et al.* (2024) que investigaram o potencial antibacteriano, modulador e antiaderente do óleo essencial de *O. vulgare* contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus saprophyticus*. Nesta pesquisa o óleo essencial de *O. vulgare* também não apresentou atividade antibiofilme contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

A clorexidina (CHX) é um biocida, lipofílica e carregada positivamente, essas propriedades permitem a interação da CHX com fosfolipídios e lipopolissacarídeos carregados negativamente da parede celular bacteriana ou da membrana externa. Em baixas concentrações (0,2%), essa interação leva a danos na parede celular e vazamento de constituintes de baixo peso molecular, como potássio e fosfato. Em concentrações mais altas (2% ou mais), a CHX entra na membrana plasmática causando citólise, liberação de componentes intracelulares e coagulação e precipitação das proteínas citoplasmáticas devido à formação de compostos de fosfato, o que por sua vez leva à morte celular (Abbood, Hijazi e Gould, 2023).

Considerando seu uso generalizado ao longo de muitas décadas, a resistência à CHX, assim como, possível resistência coincidente ao biocida e resistência a antibióticos são clinicamente relevantes. Observou-se um aumento na resistência à CHX de aproximadamente 2,8 vezes ao longo de 50 anos. Além disso, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* foram todas encontradas com maior resistência à CHX ao longo do tempo (Buxser, 2021). Três mecanismos de redução da suscetibilidade/resistência à CHX foram descritos: aumento da atividade da bomba de efluxo, alteração na permeabilidade da membrana e formação de biofilme (Hassan *et al.*, 2013; Abbood, Hijazi e Gould, 2023).

Na avaliação da associação do S-(-)-Limoneno com os antibacterianos sintéticos frente a cepas *Klebsiella pneumoniae* observou-se efeitos sinérgicos, indiferentes e antagônicos com destaque para a associação com a gentamicina que apresentou efeito sinérgico com a maior parte das cepas. Os resultados corroboram novamente com o estudo de Costa *et al.* (2019) que na atividade moduladora da gentamicina, o R-(+)-Limoneno isolado apresentou sinergismo contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. O efeito sinérgico da associação de terpenos com antimicrobianos

padrões frente a cepas de *K. pneumoniae* também foi observado no estudo de Lima (2018) que avaliou a atividade antimicrobiana de terpenos (citrinal, linalol e eucaliptol) e antimicrobianos convencionais (amicacina, gentamicina, tigeciclina e polimixina B) contra nove isolados clínicos de *K. pneumoniae* com destaque para o linalol que teve efeito sinérgico com todos os antimicrobianos testados.

Atividade sinérgica de óleo essencial rico em terpenos com a gentamicina foi observada anteriormente no trabalho de Rodrigues, Costa e Coutinho (2009). Neste estudo avaliou-se a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Croton zehntneri* e a associação do mesmo com a gentamicina. Além de inibir o crescimento bacteriano, ao ser associado à gentamicina a atividade do antimicrobiano sintético aumentou em 42,8% contra a *Pseudomona aeruginosa*. A análise cromatográfica do óleo essencial de *Croton zehntneri* identificou 97,4% dos constituintes químicos entre mono- e sesquiterpenos, sendo reconhecido como componente majoritário o estragol, representando 76,8% do teor do óleo essencial (Costa *et al.*, 2008).

Esses dados corroboram também com os resultados de Sreepian *et al.* (2022) que avaliaram atividades antibacterianas de OEs cítricos extraídos das cascas dos frutos de *Citrus. reticulata* e *Citrus. aurantifolia*, assim como, do limoneno (maior constituinte dos OEs) isoladamente e em combinação com gentamicina, frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (*S. aureus* resistente à metilicina, MRSA) e *S. aureus* ATCC 25923 (*S. aureus* sensível à metilicina, MSSA), bem como clinicamente isolados MRSA e MSSA.

Observou-se forte ação antibacteriana nos OEs e limoneno isolado em todas as cepas testadas (CIM 0–32,0mg/mL), assim como, em efeito combinado, os resultados mostraram a interação sinérgica da gentamicina com o limoneno nos isolados de MRSA (índice de concentração inibitória fracionária: 0,012–0,375) (Sreepian *et al.*, 2022).

Outros estudos vêm demonstrando atividade sinérgica do limoneno com antibacterianos sintéticos como Schroder *et al.* (2022) onde avaliou-se a suscetibilidade antimicrobiana do limoneno, do clotrimazol e das misturas entre eles, para três microrganismos: *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, realizou-se estudos de validação *in vitro* da ação antimicrobiana de algumas fontes naturais de limoneno (diferentes óleos essenciais de espécies cítricas) e misturas de cada um com clotrimazol para *Escherichia*

coli, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* MRSA e *Pseudomonas aeruginosa*.

A partir dos resultados obtidos concluiu-se que, no caso da *E.coli* e *S. aureus*, a mistura entre clotrimazol e limoneno diminui a faixa de concentração à qual esse microrganismo é suscetível, em níveis na faixa de 19µg/mL para 9,5µg/mL e 156µg/mL para 78µg/mL, respectivamente. Nos estudos de validação verificou-se um claro sinergismo entre a mistura de clotrimazol e diferentes fontes de limoneno (óleos essenciais cítricos) contra *S. aureus*, *S. aureus* MRSA e *P. aeruginosa*, com os melhores resultados para o óleo essencial de *Citrus bergamia* para *S. aureus* MRSA e *P. aeruginosa* (Schroder *et al.*, 2022).

Sieniawska *et al.* (2017) descreveram a influência dos terpenos naturais na atividade antimicobacteriana de drogas tuberculostáticas de primeira linha contra o *Mycobacterium tuberculosis* isolado. Os terpenos naturais utilizados neste estudo foram R-Limoneno, (S)-Limoneno, mirceno, sabineno, α -pineno e β -elemeno isolados e associados a antibacterianos padrões. Os ensaios de atividade antimicrobiana mostraram que o (S)-Limoneno isolado apresentou CIM de 64µg/mL em sua forma isolada. Os valores da CIM para esses terpenos, bem como para combinações com antibacterianos tuberculostáticos (etambutol, isoniazida e rifampicina), foram determinados usando um método de diluição de tubo foi na faixa de 125-0,059µg/mL.

Das combinações de terpenos com antibacterianos tuberculostáticos de primeira linha, o (S)-Limoneno teve um alto efeito sinérgico com todos os antibacterianos: (S)-Limoneno + ethambutol 0,475µg/mL, (S)-Limoneno + ethambutol 0,475µg/mL e (S)-Limoneno + rifampicina 0,237µg/mL (intervalo de CIM 0,237–0,475µg/mL) (Sieniawska *et al.*, 2017).

No ano seguinte, Sieniawska *et al.* (2018) continuaram seu estudos sobre a influência de terpenos naturais na atividade antimicrobiana de drogas tuberculostáticas de primeira linha contra Mtb agora com duas cepas de referência (virulenta Mtb H37Ra ATTC 25177 e virulenta H37Rv ATTC 25618), bem como cinco isolados clínicos (192 - cepa suscetível; 12331 - cepa resistente a isoniazida, rifampicina e etambutol ; 256/16 - cepa resistente rifampicina; 85/13 - cepa pertencente à família *Beijing*, resistente a estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol; 126 - cepa resistente a isoniazida).

Os terpenos naturais utilizados neste estudo novamente foram R-Limoneno, (S)-Limoneno, mirceno, sabineno, α -pineno e β -elemeno. Na pesquisa acima o (S)-Limoneno apresentou CIM para as cepas H37Ra, H37Rv, 192, 12331, 253/16, 85/13 e 126 de 32 μ g/mL, 256 μ g/mL, 256 μ g/mL, 512 μ g/mL, >512 μ g/mL, >512 μ g/mL e 256 μ g/mL, respectivamente.

Entretanto, quando associado com todos os antibacterianos testados o (S)-Limoneno teve um forte efeito sinérgico. Tanto os valores de CIM obtidos para antibacterianos testados na presença de concentrações subinibitórias do (S)-Limoneno quanto os valores de CIM obtidos para o (S)-Limoneno testado na presença de concentrações sub-inibitórias dos antibacterianos reduziram para todas as cepas testadas com valores chegando a 0,0625 μ g/mL (Sieniawska *et al.*, 2018).

Desta forma, através dos estudos de Sieniawska *et al.* (2017) e Sieniawska *et al.* (2018) pode-se observar que o (S)-Limoneno apresenta forte ação antimicrobiana contra cepas do Mtb isoladas e clínicas, reduzindo a CIM dos antimicrobianos mais utilizados, inclusive em concentrações subinibitórias.

Em seguida passou-se a avaliar os ensaios de desenvolvimento e caracterização da nanoemulsão e nanoemulgel que foram desenvolvidas nanoformulações para auxiliar na aplicação do S-(-)-Limoneno no tratamento de infecções em lesões de pele causadas pela *K. pneumoniae*. Nesta etapa observou-se a CIM₅₀ de 1000 μ g/mL assim como no produto isolado. Passando para o teste de susceptibilidade das cepas de *K. pneumoniae* ao NG incorporado com S-(-)-Limoneno utilizou-se a cepa Kp110 observando-se um efeito antibacteriano pela formação de um halo de inibição de 20mm.

Sistemas de distribuição baseados em nanoemulsões com constituintes incorporados aumentam significativamente a atividade antimicrobiana em comparação com sistemas não encapsulados e são promissores por serem capazes de aumentar a concentração dos compostos bioativos em áreas onde os microrganismos estão preferencialmente localizados (Lu *et al.*, 2018).

Segundo Lopes *et al.* (2017) os surfactantes são adicionados ao sistema visando produzir emulsões estáveis, sendo sua seleção fundamental para a estabilidade adequada do sistema. Uma consideração significativa na seleção de surfactantes adequados é a identificação do valor EHL da fração de óleo. Os autores seguem citando que, uma metodologia simples para determinar o EHL de um óleo essencial é a análise da estabilidade a curto prazo de emulsões produzidas com o

produto-teste e surfactantes de valores variados de EHL. O valor de EHL da emulsão mais estável é considerado o EHL requerido do produto.

Para Lu *et al.* (2014a) os valores adequados de EHL dos surfactantes mistos são fator chave para a formação de gotículas de emulsão e durante a formação da emulsão O/A, os surfactantes lipofílicos têm mais afinidade com as gotículas dispersas da emulsão do que o surfactante hidrofílico. Seguem afirmando que, um valor de EHL adequado é necessário para manter o equilíbrio da fase oleosa e da fase aquosa e, com valores ideais, é possível estabilizar e estreitar as gotículas recém-formadas durante a emulsificação.

A mistura de dois surfactantes apresenta efeito sinérgico na formação de emulsões de estabilidade com grupos de cabeça idênticos, mas com caudas de hidrocarbonetos diferentes. Além disso, durante a emulsificação por ultrasonicação, a cavitação ajuda a dispersar o produto em pequenas gotas e então o surfactante misturado é rapidamente adsorvido na superfície das gotículas recém-formadas para acelerar a formação de nanoemulsões (Lu *et al.*, 2014b).

No estudo de Sohan *et al.* (2023) avaliou-se a estabilidade física e química de nanoemulsões contendo D-Limoneno armazenadas em diferentes temperaturas (ambiente e refrigeradas) por um período de 30 dias. As NEs apresentaram aumento no tamanho da gotícula a partir do D1 até p D30 com picos que variaram de 111nm até 433nm corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa. Para os autores, o amadurecimento e a coalescência de *Ostwald* são possíveis mecanismos desestabilizadores do crescimento do tamanho das gotículas de óleo.

Segundo Piorkowski e McClements (2014) o amadurecimento de *Ostwald* é um fenômeno comum observado em óleos essenciais, triglicerídeos de cadeia curta e emulsões aromatizantes de óleo em água, este corre quando as moléculas de óleo se difundem de gotículas pequenas para grandes através da fase aquosa, fazendo com que as gotículas maiores consumam as menores.

O pH emulsões preparadas utilizando diferentes concentrações de óleo apresentaram estabilidade em toda a faixa de pH (3 a 9) sem indicar crescimento de gotículas ou instabilidade perceptível. O mesmo apresenta mínima influência na estabilidade das emulsões que incorporavam emulsificantes não iônicos (Sohan *et al.*, 2023; Cho; McClements, 2009).

Sonu *et al.* (2018) formularam NEs contendo R-(+)-Limoneno para ensaios microbiológicos com tamanho médio de partícula de 116,60 \pm 5,30nm e índice de

polidispersão $0,205 \pm 0,02$. O pH da nanoemulsão otimizada de óleo de D-Limoneno foi de $6,50 \pm 0,15$. O valor relativamente menor de PDI para nanoemulsão pode ser correlacionado com maior estabilidade no armazenamento.

Assim como os autores acima citados, Sabry *et al.* (2014) tiveram resultados semelhantes ao investigarem as capacidades antioxidantes, antimicrobianas e antifúngicas dos extratos oleosos das cascas de laranja e tangerina (com 92% de Limoneno identificado pela Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa) encapsulados em NEs. As NEs formuladas eram estáveis apresentando tamanho médio de gotícula ($<100\text{nm}$) e PDI ($<0,2$) baixos, entretanto, a NE com o óleo extraído da casca da laranja (*Citrus sinensis L.*) aumentou o tamanho das gotículas para acomodar a carga solubilizada dos extratos. Como anteriormente abordado, o maior tamanho de gotículas da NE e sua menor estabilidade se deve aos fenômenos de amadurecimento de *Ostwald* associados à natureza do extrato fenólico, que possui compostos hidrofílicos e hidrofóbicos.

Em muitos casos, os surfactantes por si só podem reduzir insuficientemente a tensão interfacial entre o óleo e a água, formando pequenas gotículas. A adição de álcoois de cadeia curta ou média como co-tensioativo podem reduzir mais a tensão interfacial óleo/água. Estes se localizam entre as caudas de hidrocarbonetos do surfactante, o que poderia estabilizar a camada interfacial das nanoemulsões. Assim, o surfactante e o co-surfactante são considerados partes importantes, que podem influenciar a formação da nanoemulsão em termos de tamanho e estabilidade das partículas (Charoenjittichai; Charnvanich; Panapisal, 2016).

Para Patel e Joshi (2012) a instabilidade da nanoemulsão é devida a alguns fatores principais, incluindo formação de creme, floculação, coalescência e amadurecimento de *Ostwald*, sendo este último o principal fator.

Ao se realizar o estudo da atividade antibacteriana da nanoemulsão do S-(-)-limoneno contra as cepas de *K. pneumoniae* observou-se um moderado efeito antibacteriano segundo Sartoratto *et al.* (2004) com CIM_{50} de $1000\mu\text{g/mL}$. Zhang *et al.* (2014) estudaram a atividade antimicrobiana de nanoemulsão contendo D-Limoneno contra as cepas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633, a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 8739 e a levedura *S. cerevisiae* ATCC 9763. A NE do D-Limoneno exibiu elevados efeitos inibitórios no que diz respeito ao crescimento em todos os quatro microrganismos,

com CIM de 7,5µg/mL contra *S. aureus* e *S. cerevisiae*, já contra *B. subtilis* e *E. coli* a CIM foi de 15µg/mL.

Assim como Zhang *et al* (2015), Bei *et al.* (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana de nanoemulsão com D-limoneno contra as cepas de *S. aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Escherichia coli* ATCC 8739. A CIM da nanoemulsão para as cepas testados foi de 5,47µg/mL, 10,94µg/mL e 42,15µg/mL, respectivamente.

Os resultados do estudo de Sonu *et al.* (2018) também corroboram com os apresentados nesta pesquisa, os autores verificaram atividade antimicrobiana de NE contendo 5% de limoneno contra os microrganismos *B. cereus* (ATCC 14459), *E. faecalis* (NCDC 115), *E. coli* (ATCC 25922) e *Salmonella typhi* (NCDC 6017) e em todas as cepas testadas observou-se atividade bactericida com CIM de 12,50µg/mL.

No estudo de Shao *et al.* (2018) desenvolveu-se um revestimento comestível incorporando diferentes concentrações de emulsão de R-(+)-Limoneno e avaliou-se a eficácia antimicrobiana de revestimentos comestíveis à base de emulsões contendo R-(+)-Limoneno contra diferentes bactérias inoculadas (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) em morangos.

A CIM das emulsões de R-(+)-limoneno foi de 625µg/mL para *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* e 1250µg/mL para *Staphylococcus aureus*. As emulsões contendo R-(+)-Limoneno melhoraram a estabilidade microbiana dos morangos e resultaram eficazes na descontaminação de patógenos externos testados (Shao *et al.*, 2018).

Com relação ao efeito antibacteriano do nanoemulgel contra as cepas de *K. pneumoniae* observou-se efeito antibacteriano segundo Bona *et al.* (2014) visto da formação de halo de inibição de 20mm. Este resultado vai de acordo com os estudos de Mehanna, Mneimneh e Abed El Jalil (2020) que desenvolveram nanoemulgel ocular *in-situ* eficaz à base de limoneno para aumentar a eficácia das fluoroquinolonas (levofloxacino) contra a infecção do biofilme ocular associada ao *Staphylococcus Aureus* resistente à metilina (MRSA). O tamanho da partícula do nanoemulgel à base de limoneno carregado com levofloxacina foi de 119,2 ±0,321nm, com uma distribuição de tamanho unimodal caracterizada por um baixo índice de polidispersão (0,314±0,05) refletindo a uniformidade do diâmetro e a homogeneidade da preparação.

A CIM do nanoemulgel à base de limoneno sozinho foi de 25µg/mL, enquanto do nanoemulgel à base de limoneno carregado com levofloxacino foi de 3,12 µg/mL,

sendo menor que a do medicamento (6,2 µg/mL). Neste caso, o limoneno apresentou efeito sinérgico ao antibacteriano testado no combate às infecções por MRSA. Os valores de CBM foram 50µg/mL, 12,5µg/mL e 25µg/mL, respectivamente (Mehanna; Mneimneh; Abed El Jalil, 2020).

Atividade antibacteriana do nanogel (tamanho de gotícula de 196 ±8nm) incorporado com OE de *Mentha spicata*, que possui o limoneno como seu segundo maior componente, contra de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi investigada por Rasti *et al.* (2022). Os autores observaram a potência do nanogel com um valor da Concentração Inibitória Média (IC₅₀) de 55µg/mL, substancialmente menor do que a do óleo essencial isolado (997,4µg/mL). Além disso, o crescimento das cepas bacterianas testadas após o tratamento com nanogel 1000µg/mL diminuiu cerca de 50% em comparação com o grupo controle.

Zarenezhad *et al.* (2021) formularam e investigaram a atividade antimicrobiana de nanogel incorporado com óleo essencial de *Citrus limon* contra *Leishmania tropica* e *Leishmania major*. O OE de *C. limon* possui como seu constituinte principal o limoneno (61,83%) e o nanogel foi formulado a partir de NE com 4 µg/mL do OE e que apresentou parâmetros aceitáveis para os autores (tamanho da gotícula 146 ± 12nm e PDI de 0,96 ± 0,02). Efeito leishmanicida do nanogel foi observado a partir da viabilidade de *L. tropica* após 24 h de incubação que reduziu de 80% para 40% quando comparado com o OE isolado. A viabilidade de *L. major* também teve redução expressiva quando comparado o efeito do OE isolado e do nanogel incorporado com o OE (de 82% para 43%). Além disso, um efeito leishmanicida perfeito (viabilidade de 0%) foi alcançado contra *L. major* e *L. tropica* usando nanogel com 8 µg/mL do óleo.

Por fim, a análise química de séries de óleos essenciais mostrou que os principais componentes ativos antimicrobianos são fenóis, terpenos, aldeídos e cetonas, e acredita-se geralmente que os óleos essenciais atuam principalmente contra a membrana citoplasmática celular. Os principais mecanismos de ação do limoneno são contra as membranas citoplasmáticas dos microrganismos, causando perda da integridade da membrana; a inibição de enzimas respiratórias; e dissipação da força próton-motriz (Zhang *et al.*, 2015).

7 CONCLUSÃO

Portanto, com relação a esta pesquisa pode-se observar que em relação ao S-(-)-Limoneno:

- Apresentou efeito antibacteriano moderado e bacteriostático contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae*;
- Quando isolado não apresentou atividade antiaderente.
- Apresentou um efeito sinérgico para a maior parte das cepas em relação à associação com gentamicina;
- Desenvolveu-se nanoemulsão com potencial antibacteriano moderado, assim como, nanoemulgel também com potencial antibacteriano ambas formulações com tamanho de partícula, PDI e características macroscópicas estáveis por período de 90 e 60 dias, respectivamente.

Desta forma, conclui-se que o S-(-)-Limoneno é um candidato ao desenvolvimento de novas tecnologias farmacológicas para o tratamento de lesões de pele infectadas com *K. pneumoniae* isolado ou em formulações com sistemas emulsionados (nanoemulsão e nanoemulgel).

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, Ingy I.; QUAX, Wim J. *A Glimpse into the Biosynthesis of Terpenoids. In: International Conference on Natural Resources and Life Sciences (NRLS-2016)*. KnE Life Sciences, 2017. p. 81-98.
- ABBOOD, Hadeel Mohammed; HIJAZI, Karolin; GOULD, Ian M. *Chlorhexidine resistance or cross-resistance, that is the question. Antibiotics*, v. 12, n. 5, p. 798, 2023.
- ABREU, Ana Cristina; MCBAIN, Andrew J.; SIMÕES, Manuel. *Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. Natural product reports*, v. 29, n. 9, p. 1007-1021, 2012.
- ALBUQUERQUE, ACL de et al. Efeito antiaderente do extrato da *Matricaria recutita* Linn. Sobre microorganismos do biofilme dental. *Rev Odontol UNESP*, v. 39, n. 1, p. 21-5, 2010.
- ALFEI, Silvana; SCHITO, Anna Maria. *From nanobiotechnology, positively charged biomimetic dendrimers as novel antibacterial agents: A review. Nanomaterials*, v. 10, n. 10, p. 2022, 2020.
- ALGAHTANI, Mohammed S.; AHMAD, Mohammad Zaki; AHMAD, Javed. *Nanoemulgel for improved topical delivery of retinyl palmitate: formulation design and stability evaluation. Nanomaterials*, v. 10, n. 5, p. 848, 2020.
- ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J. et al. *Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. Phytomedicine*, v. 90, p. 153626, 2021.
- BAUER, A. W. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J clin pathol*, v. 45, p. 149-158, 1966.
- BEI, Weiya et al. *Organogel-nanoemulsion containing nisin and D-limonene and its antimicrobial activity. Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 1010, 2015.
- BOMFIM, Emiliania de Omena; CAVALCANTE, Giani Maria; SANTOS, Marcileide da Silva. *Potencial antimicrobiano do extrato de Schinus terebenthifolius sobre exsudatos de úlceras por pressão. Revista Saúde.com*, v. 8, n. 1, p. 14-23, 2012.
- BONA, Eliana Almeida Mira De et al. *Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. Arquivos do Instituto Biológico*, v. 81, p. 218-225, 2014.
- BUHLER F. V, FERREIRA J.R.N. *Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações contendo extratos de Ilem pomguoriensis St. Hil. a 5 e 10%. Revista Perspectiva.*, v.32, p. 47-55, 2008.

BURNHAM, Paul M. *Limonene: The industrial degreasing agent found in orange peel*. Disponível em: <https://www.chm.bris.ac.uk/motm/limonene/limonenejm.htm>. Acesso em: 05/12/2023.

BUXSER, Stephen. *Has resistance to chlorhexidine increased among clinically-relevant bacteria? A systematic review of time course and subpopulation data*. **PLoS One**, v. 16, n. 8, p. e0256336, 2021.

CARVALHO JR, Alexander R. *et al. Use of some asteraceae plants for the treatment of wounds: from ethnopharmacological studies to scientific evidences*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 784, 2018.

CHAROENJITTICHAJ, R; CHARNVANICH, D; PANAPISAL, V. *Effects of surfactant mixture ratio and concentration on nanoemulsion physical stability*. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)**, v. 40, 2016.

CHO, Young-Hee; MCCLEMENTS, David Julian. *Theoretical stability maps for guiding preparation of emulsions stabilized by protein-polysaccharide interfacial complexes*. **Langmuir**, v. 25, n. 12, p. 6649-6657, 2009.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E.; LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. Willians. & Wikins, 1991.

CLEGG, Steven; MURPHY, Caitlin N. **Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae***. In: Mulvey, Matthew A.; Klumpp, David J.; Stapleton, Ann E. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*. 2ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2017, p. 435-457.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth International Supplement*. **CLSI document M27-4**. 2012.

COSTA, Maria Do S. *et al. Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of d-limonene alone and complexed with β -cyclodextrin*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 128, p. 158-161, 2019.

COSTA, José GM *et al. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol)*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 583-586, 2008.

DANAEI, M. R. M. M. *et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems*. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DANTAS RIBEIRO, Adyelle *et al. Antimicrobial activity of limonene: Integrative review*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 22, n. 5, 2023.

DIAS, Alline Laiane Borges *et al. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian plants and their major constituents against foodborne pathogens and spoilage bacteria*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 34, n. 3, p. 195-202, 2022.

DINIZ, Aline de Farias *et al.* *Evaluation of the antibacterial, modulatory and anti-adherent properties of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against food pathogenic bacteria.* **Semina: Ciências Agrárias**, v. 45, n. 1, p. 7-22, 2024.

EDDIN, Lujain Bader *et al.* *Neuroprotective potential of limonene and limonene containing natural products.* **Molecules**, v. 26, n. 15, p. 4535, 2021.

EL HACHLAFI, Naoufal *et al.* *Health benefits and pharmacological properties of hinokitiol.* **Processes**, v. 9, n. 9, p. 1680, 2021.

ESPINA, Laura *et al.* *Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes.* **Food control**, v. 22, n. 6, p. 896-902, 2011.

ESPINA, Laura *et al.* *Mechanism of bacterial inactivation by (+)-limonene and its potential use in food preservation combined processes.* **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56769, 2013.

ESPINA, Laura *et al.* *Individual constituents from essential oils inhibit biofilm mass production by multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*.* **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11357-11372, 2015.

FERNANDES, Luiziana Cavalcante Costa *et al.* *Nanotechnology: concepts and potential applications in medicine.* **Nanomaterials and Nanotechnology: Biomedical, Environmental, and Industrial Applications**, p. 1-39, 2021.

FERREIRA, Joana Margarida Costa. ***Klebsiella pneumoniae e a ameaça da resistência aos antibióticos.*** 2022. Dissertação de Mestrado. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade de Lisboa. Faculdade de Farmácia, 2022.

FRANZOL, Angélica; REZENDE, Mirabel Cerqueira. *Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico.* **Polímeros**, v. 25, n. spe, p. 1-9, 2015.

GARRE, Alberto *et al.* *Limonene nanoemulsified with soya lecithin reduces the intensity of non-isothermal treatments for inactivation of *Listeria monocytogenes*.* **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3656, 2020.

GIDEY, Kidu *et al.* *Clinical and economic burden of healthcare-associated infections: A prospective cohort study.* **Plos one**, v. 18, n. 2, p. e0282141, 2023.

GOERING *et al.* *Bactérias.* In: GOERING *et al.* **MIMS Microbiologia Médica e Imunologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Gianabara Koogan, 2020.

GONZALEZ-FERRER, Shekina *et al.* *Finding order in the chaos: outstanding questions in *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis.* **Infection and immunity**, v. 89, n. 4, p. 10.1128/iai.00693-20, 2021.

GORRIE, Claire L. *et al.* *Genomic dissection of *Klebsiella pneumoniae* infections in hospital patients reveals insights into an opportunistic pathogen.* **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 3017, 2022.

GUERRA, Felipe Queiroga Sarmiento *et al.* *Chemical composition and antimicrobial activity of Cinnamomum zeylanicum Blume essential oil on multi-drug resistant Acinetobacter spp. strains.* **Biofar**, v. 8, n. 1, p. 62-70, 2012.

GUIMARÃES, Aline Cristina *et al.* *Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils.* **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2471, 2019.

GUPTA, Akshi; JEYAKUMAR, Ebenezer; LAWRENCE, Rubina. *Journey of limonene as an antimicrobial agent.* **Journal of Pure & Applied Microbiology**, v. 15, n. 3, 2021a.

GUPTA, Akshi; JEYAKUMAR, Ebenezer; LAWRENCE, Rubina. *Strategic approach of multifaceted antibacterial mechanism of limonene traced in Escherichia coli.* **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 13816, 2021b.

GUZEK, A. *et al.* *Etiological factors causing lower respiratory tract infections isolated from hospitalized patients.* **Respiratory Infections**, p. 37-44, 2015.

HAFIDH, Rand R. *et al.* *Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product.* **The open microbiology journal**, v. 5, p. 96, 2011.

HAN, Yingjie; CHEN, Wenxue; SUN, Zhichang. *Antimicrobial activity and mechanism of limonene against Staphylococcus aureus.* **Journal of Food Safety**, v. 41, n. 5, p. e12918, 2021.

HAN, Yu-Ling *et al.* *Epidemiological characteristics and molecular evolution mechanisms of carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae.* **Frontiers in microbiology**, v. 13, p. 1003783, 2022.

HASSAN, Karl A. *et al.* *Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins.* **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 50, p. 20254-20259, 2013.

KARIM, Aiman *et al.* *Alginate-based nanocarriers for the delivery and controlled-release of bioactive compounds.* **Advances in colloid and interface science**, v. 307, p. 102744, 2022.

KVITTINGEN, Lise; SJURSNES, Birte Johanne; SCHMID, Rudolf. *Limonene in Citrus: a string of unchecked literature citations?.* **Journal of Chemical Education**, v. 98, n. 11, p. 3600-3607, 2021.

LAL, Diwya Kumar *et al.* *An overview of nanoemulgels for bioavailability enhancement in inflammatory conditions via topical delivery.* **Pharmaceutics**, v. 15, n. 4, p. 1187, 2023.

LAN, Peng *et al.* *Core genome allelic profiles of clinical Klebsiella pneumoniae strains using a random forest algorithm based on multilocus sequence typing scheme for hypervirulence analysis.* **The Journal of infectious diseases**, v. 221, n. Supplement_2, p. S263-S271, 2020.

- LEE, Gun Woong *et al.* Direct suppression of a rice bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) by monoterpene (S)-limonene. **Protoplasma**, v. 253, p. 683-690, 2015.
- LI, Jiao *et al.* Evaluation of ultrasound-induced damage to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by flow cytometry and transmission electron microscopy. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 6, p. 1828-1837, 2016.
- LIMA, Raissa Ximenes. **Atividade antimicrobiana de terpenos e antibióticos convencionais e suas associações frente *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Universidade Federal de Pernambuco. 2018.
- LIU, Chao *et al.* Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* is emerging as an increasingly prevalent *K. pneumoniae* pathotype responsible for nosocomial and healthcare-associated infections in Beijing, China. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 1215-1224, 2020.
- LOPES, Pablo Queiroz *et al.* Technological evaluation of emulsions containing the volatile oil from leaves of *Plectranthus amboinicus* Lour. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 49, p. 159, 2017.
- LU, Wen-Chien *et al.* Nanoemulsion of D-limonene in water system prepared by ultrasonic emulsification. **Journal of cosmetic science**, v. 65, n. 4, p. 245-252, 2014a.
- LU, Wen-Chien *et al.* Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 1, p. 82-89, 2018.
- LU, Wen-Chien *et al.* Skin permeation of d-limonene-based nanoemulsions as a transdermal carrier prepared by ultrasonic emulsification. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 21, n. 2, p. 826-832, 2014b.
- MABOU, Florence Déclaire; YOSSA, Irma Belinda Nzeuwa. **TERPENES: Structural classification and biological activities**. **IOSR J. Pharm. Biol. Sci. e-ISSN**, v. 16, p. 2319-7676, 2021.
- MAN, Tom JB *et al.* Genomic analysis of a pan-resistant isolate of *Klebsiella pneumoniae*, United States 2016. **MBio**, v. 9, n. 2, p. 10.1128/mbio. 00440-18, 2018.
- MANANDHAR, Sarita; LUITEL, Shisir; DAHAL, Raj Kumar. *In vitro* antimicrobial activity of some medicinal plants against human pathogenic bacteria. **Journal of tropical medicine**, v. 2019, 2019.
- MASYITA, Ayu *et al.* Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. **Food chemistry: X**, v. 13, p. 100217, 2022.
- MEHANNA, Mohammed M.; MNEIMNEH, Amina Tarek; ABED EL JALIL, Khaled. *Levofloxacin-loaded naturally occurring monoterpene-based nanoemulgel: a feasible*

efficient system to circumvent MRSA ocular infections. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n. 11, p. 1787-1799, 2020.

MOHAMED, Nesma Atef et al. Distribution, characterization and antibiotic resistance of hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae* (hvKp) strains versus classical strains (CKp) causing healthcare associated infections in Sohag University Hospitals. **Microbes and Infectious Diseases**, v. 5, n. 2, p. 734-744, 2024.

MOHD NARAWI, Masturah et al. Biocompatible nutmeg oil-loaded nanoemulsion as phyto-repellent. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 214, 2020.

MONTAGNER, D.; CORREIA, G.M. Avaliação da estabilidade de cremes com uréia em diferentes pHs. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.85, n.3, p.69-72, 2004.

MORADI, Sara; BARATI, Abolfazl. Essential Oils Nanoemulsions: Preparation, Characterization and Study of Antibacterial Activity against *Escherichia Coli*. **International Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 3, p. 199-210, 2019.

MORGAN, Sarah J. et al. Bacterial fitness in chronic wounds appears to be mediated by the capacity for high-density growth, not virulence or biofilm functions. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 3, p. e1007511, 2019.

MOURA, Samara KSCF et al. Design of a thermosensitive ibuprofen-loaded nanogel as smart material applied as anti-inflammatory in tooth bleaching: An in vivo study. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 68, p. 103123, 2022.

MUILU-MÄKELÄ, Riina et al. Antibacterial and oxidative stress-protective effects of five monoterpenes from softwood. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3891, 2022. 3891 (2022).

NAIR, Arya et al. Nanoparticles—Attractive carriers of antimicrobial essential oils. **Antibiotics**, v. 11, n. 1, p. 108, 2022.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African journal of biotechnology**, v. 7, n. 12, 2008.

NDLOVU, Thando et al. Evaluation of Potential Factors Influencing the Dissemination of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and Alternative Treatment Strategies. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 8, p. 381, 2023.

NINKUU, Vincent et al. Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5710, 2021.

NOSRATI, Mokhtar et al. Antibacterial and antibiofilm activities of *Prangos acaulis* Bornm. extract against *Streptococcus mutans*: an in silico and in vitro study. **Journal of Herbmед Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 176-184, 2018.

OJHA, Brijesh et al. Nanoemulgel: A promising novel formulation for treatment of skin ailments. **Polymer Bulletin**, v. 79, n. 7, p. 4441-4465, 2022.

OLIVEIRA, Rinalda A. *et al.* Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 77-82, 2006.

OSTROSKY, Elissa A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PACZOSA, Michelle K.; MECASAS, Joan. *Klebsiella pneumoniae: going on the offense with a strong defense.* **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PALOMINO, Juan-Carlos *et al.* Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PARROTT, A. M. *et al.* Detection of multiple hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in a New York City hospital through screening of virulence genes. **Clinical microbiology and infection**, v. 27, n. 4, p. 583-589, 2021.

PATEL, Ronak P.; JOSHI, Jay R. An overview on nanoemulsion: a novel approach. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 12, p. 4640, 2012.

PATHIRANA, Hansani NKS *et al.* Antibacterial activity of lime (*Citrus*) essential oil and limonene against fish pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder (*Lateolabrax niloticus*). **Fisheries & Aquatic Life**, v. 26, n. 2, p. 131-139, 2018.

PEKMEZOVIC, Marina *et al.* Prevention of polymicrobial biofilms composed of *Pseudomonas aeruginosa* and pathogenic fungi by essential oils from selected *Citrus* species. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 74, n. 8, p. ftw102, 2016.

PENDLETON, Jack N.; GORMAN, Sean P.; GILMORE, Brendan F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 3, p. 297-308, 2013.

PERES, E. M. *et al.* Microbiological identification and resistance profile of microorganisms in pressure injuries after the use of polyhexamethylene biguanide: a series of fourteen cases. **Wounds: a Compendium of Clinical Research and Practice**, v. 33, n. 2, p. 51-56, 2022.

PIORKOWSKI, Daniel T.; MCCLEMENTS, David Julian. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food hydrocolloids**, v. 42, p. 5-41, 2014.

PREETI *et al.* Nanoemulsion: an emerging novel technology for improving the bioavailability of drugs. **Scientifica**, v. 2023, n. 1, p. 6640103, 2023.

PREMAKSHI, H. G.; RAMESH, K.; KARIDURAGANAVAR, M. Y. Modification of crosslinked chitosan membrane using NaY zeolite for pervaporation separation of

water–isopropanol mixtures. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 94, p. 32-43, 2015.

PUNJATAEWAKUPT, Apirujee; NAPAVICHAYANUN, Supamas; ARAMWIT, Pornanong. *The downside of antimicrobial agents for wound healing*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 38, p. 39-54, 2019.

PUVAČA, Nikola *et al.* *Antimicrobial activity of selected essential oils against selected pathogenic bacteria: In vitro study*. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 546, 2021.

PUVAČA, Nikola *et al.* *Influence of different tetracycline antimicrobial therapy of mycoplasma (*Mycoplasma synoviae*) in laying hens compared to tea tree essential oil on table egg quality and antibiotic residues*. **Foods**, v. 9, n. 5, p. 612, 2020.

RAHIM, Kashif *et al.* *Bacterial contribution in chronicity of wounds*. **Microbial ecology**, v. 73, p. 710-721, 2017.

RAHIMI, Mahdi *et al.* *Carbohydrate polymer-based silver nanocomposites: Recent progress in the antimicrobial wound dressings*. **Carbohydrate polymers**, v. 231, p. 115696, 2020.

RASTEGAR, Sanaz *et al.* *Virulence factors, capsular serotypes and antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and classical *Klebsiella pneumoniae* in Southeast Iran*. **Infection & chemotherapy**, v. 51, 2019.

RASTI, Fatemeh *et al.* *Antioxidative, anticancer, and antibacterial activities of a nanogel containing *Mentha spicata* L. essential oil and electrospun nanofibers of polycaprolactone-hydroxypropyl methylcellulose*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 22, n. 1, p. 261, 2022.

RICE, Louis B. *Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE*. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079-1081, 2008.

RODRIGUES, Melanie *et al.* *Wound healing: a cellular perspective*. **Physiological reviews**, v. 99, n. 1, p. 665-706, 2019.

RODRIGUES, Fabíola FG; COSTA, José GM; COUTINHO, Henrique DM. *Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri**. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 1052-1055, 2009.

RUSSO, Thomas A. *et al.* *Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae**. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 9, p. 10.1128/jcm. 00776-18, 2018.

SABRY, Bassem A. *et al.* *Validating the protective role of orange and tangerine peel extracts for amending food safety against microorganisms' contamination using molecular docking*. **Heliyon**, 2024.

SAH, Shailendra Kumar; BADOLA, Ashutosh; MUKHOPADHYAY, Sayantan. *Development and evaluation of tioconazole loaded emulgel*. **Int J Appl Pharm**, v. 9, n. 5, p. 83-90, 2017.

- SAI-ANAND, Gopalan *et al.* Recent progress on the sensing of pathogenic bacteria using advanced nanostructures. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 92, n. 1, p. 216-244, 2019.
- SANI, Marc-Antoine *et al.* Bacteria may cope differently from similar membrane damage caused by the Australian tree frog antimicrobial peptide maculatin 1.1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 32, p. 19853-19862, 2015.
- SANTAJIT, Sirijan; INDRAWATTANA, Nitaya. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, n. 1, p. 2475067, 2016.
- SARTORATTO, Adilson *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.
- SCHRODER, Verginica *et al.* Studies regarding the antimicrobial behavior of clotrimazole and limonene. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, p. 1816, 2022.
- SCORZONI, Liliana *et al.* Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of microbiological methods**, v. 123, p. 68-78, 2016.
- SEGALA, Francesco Vladimiro *et al.* Impact of SARS-CoV-2 epidemic on antimicrobial resistance: A literature review. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2110, 2021.
- SETYA, Sonal *et al.* Design and development of novel transdermal nanoemulgel for Alzheimer's disease: Pharmacokinetic, pharmacodynamic and biochemical investigations. **Current Drug Delivery**, v. 16, n. 10, p. 902-912, 2019.
- SHANKAR, Dhobale *et al.* Formulation and evaluation of luliconazole emulgel for topical drug delivery. **Int. Res. J. of Science & Engineering**, v. 3, p. 85-9, 2018.
- SHAO, Ping *et al.* Antibacterial activities of R-(+)-Limonene emulsion stabilized by *Ulva fasciata* polysaccharide for fruit preservation. **International journal of biological macromolecules**, v. 111, p. 1273-1280, 2018.
- SETYA, S.; TALEGAONKAR, S.; RAZDAN, B. K. Nanoemulsions: formulation methods and stability aspects. **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 3, p. 2214–2228, 2014.
- SIENIAWSKA, Elwira *et al.* Natural terpenes influence the activity of antibiotics against isolated *Mycobacterium tuberculosis*. **Medical Principles and Practice**, v. 26, n. 2, p. 108-112, 2017.
- SIENIAWSKA, Elwira *et al.* The effect of combining natural terpenes and antituberculous agents against reference and clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 176, 2018.
- SILVA, Elisia Gomes *et al.* In vitro antimicrobial and antibiofilm activity of S-(-)-limonene and R-(+)-limonene against fish bacteria. **Fishes**, v. 6, n. 3, p. 32, 2021.

SILVA, Hélder D.; CERQUEIRA, Miguel A.; VICENTE, António A. *Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions*. **Journal of food engineering**, v. 167, p. 89-98, 2015.

SILVA, S. L. *et al.* *Evaluation of the antimicrobial effect of the Origanum vulgare L essential oil on strains of Klebsiella pneumoniae*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e269317, 2023.

SILVA, José Dilson F. da *et al.* *Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações*. **Química Nova**, v. 38, p. 1196-1206, 2015.

SINGH, Sonia; BAJPAI, Meenakshi; MISHRA, Pradeep. *Carissa carandas L.–phytopharmacological review*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 12, p. 1694-1714, 2020.

SONG, Yizhe *et al.* *Microfabrication of a tunable collagen/alginate-chitosan hydrogel membrane for controlling cell–cell interactions*. **Carbohydrate polymers**, v. 153, p. 652-662, 2016.

SOULIMANI, R.; BOUAYED, J.; JOSHI, Rakesh Kumar. *Limonene: natural monoterpene volatile compounds of potential therapeutic interest*. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 7, n. 4, p. 01-10, 2019.

SONU, K. S. *et al.* *Physico-chemical and antimicrobial properties of d-limonene oil nanoemulsion stabilized by whey protein–maltodextrin conjugates*. **Journal of food science and technology**, v. 55, p. 2749-2757, 2018.

SOUSA, Ana Beatriz Alves; RAMALHO, Fernanda Lobato; CAMARGO, Beatriz. *Prevalência de Infecções nosocomiais ocasionadas por Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase (KPC) em indivíduos hospitalizados*. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 1915-1932, 2020.

SREEPIAN, Apichai *et al.* *Antibacterial activities and synergistic interaction of citrus essential oils and limonene with gentamicin against clinically isolated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. **The Scientific World Journal**, v. 2022.

SRIVASTAVA, M.; KOHLI, K.; ALI, Mohammad. *Formulation development of novel in situ nanoemulgel (NEG) of ketoprofen for the treatment of periodontitis*. **Drug delivery**, v. 23, n. 1, p. 154-166, 2016.

SUBRAMENIUM, Ganapathy Ashwinkumar; VIJAYAKUMAR, Karuppiah; PANDIAN, Shunmugiah Karutha. *Limonene inhibits streptococcal biofilm formation by targeting surface-associated virulence factors*. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. 8, p. 879-890, 2015.

SUMANTRI, Imam B. *et al.* *The potency of wound healing of nanogel-containing Mikania micrantha leaves extract in hyperglycemic rats*. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 9, n. 5, p. 339, 2021.

TAVARES, Tânia D. *et al.* *Activity of specialized biomolecules against Gram-positive and gram-negative bacteria*. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 314, 2020.

- THOMÉ, Andrezza Maria Côrtes *et al.* Isolamento de bactérias de úlceras por pressão de pacientes internados em hospital universitário. **Revista Pró-univerSUS**, v. 9, n. 1, p. 46-50, 2018.
- TOOMBS-RUANE, Leah J. *et al.* Carriage of extended-spectrum-beta-lactamase-and AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains from humans and pets in the same households. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 24, p. e01613-20, 2020.
- TROMBETTA, Domenico *et al.* Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.
- VENKATESWARAN, Parvathy *et al.* Revisiting ESKAPE Pathogens: Virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 13, 2023.
- VIEIRA, Ana Julia *et al.* Limonene: Aroma of innovation in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 97-106, 2018.
- VIEIRA, Ana Julia *et al.* Limonene: Aroma of innovation in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 97-106, 2018.
- VOIDAZAN, Septimiu *et al.* Healthcare associated infections—a new pathology in medical practice?. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 3, p. 760, 2020.
- WANG, Guoying *et al.* The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 17, p. 6278, 2020.
- WANG, Wenjie; JUNG, Jooyeoun; ZHAO, Yanyun. Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins. **Carbohydrate polymers**, v. 157, p. 1246-1253, 2017.
- WATKINS, Richard R.; BONOMO, Robert A. Overview: global and local impact of antibiotic resistance. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 2, p. 313-322, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022–2020 data**. World Health Organization. Regional Office for Europe, 2022.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2020**. World Health Organization, 2020.
- WYRES, Kelly L.; HOLT, Kathryn E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 131-139, 2018.

ZAHI, Mohamed Reda; LIANG, Hao; YUAN, Qipeng. *Improving the antimicrobial activity of D-limonene using a novel organogel-based nanoemulsion*. **Food Control**, v. 50, p. 554-559, 2015.

ZARENEZHAD, Elham *et al.* *A nanoemulsion-based nanogel of Citrus limon essential oil with leishmanicidal activity against Leishmania tropica and Leishmania major*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 45, p. 441-448, 2021.

ZHANG, Chi *et al.* *Burden of infectious diseases and bacterial antimicrobial resistance in China: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019*. **The Lancet Regional Health–Western Pacific**, v. 43, 2024.

ZHANG, Zheng *et al.* *Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases*. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 205-218, 2013.

ZHANG, Zijie *et al.* *Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion*. **Food chemistry**, v. 150, p. 307-312, 2014.

ZHENG, Xiaoting *et al.* *Inhibitory activity of essential oils against Vibrio campbellii and Vibrio parahaemolyticus*. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1946, 2020.

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO COM AUTORIA PRINCIPAL NA REVISTA BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E SAÚDE - REBES

SILVA *et al.* Aspectos gerais, virulência e resistência a medicamentos da *Klebsiella pneumoniae*: uma breve revisão. **Revista Brasileira de Educação e Saúde-REBES**. v. 14, n.3, p.663-668, jul-set, 2024. DOI 10.18378/rebes.v14i3.10616.

Revista Brasileira de Educação e Saúde-REBES
Grupo Verde de Agroecologia e Abelhas-GVAA
ISSN: 2358-2391
DOI 10.18378/rebes.v14i3.10616



Artigo científico

Aspectos gerais, virulência e resistência a medicamentos da *Klebsiella pneumoniae*: uma breve revisão

General aspects, virulence and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae*: a brief review

Ravenna Leite da Silva¹, Andrea Fernanda Ramos de Paula², Ana Isabelle Andrade Neves³, Bruna Araújo Pires⁴, Rafaela de Oliveira Nóbrega⁵ & Abrahão Alves de Oliveira Filho⁶

¹Pós-graduada do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. Orcid: 0000-0001-9270-0618. E-mail: ravennaleite3@gmail.com.

²Pós-graduada do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. Orcid: 0000-0002-3661-9513. E-mail: andreafernanda@academico.ufpb.br.

³Pós-graduada do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. Orcid: 0000-0003-2353-6548. E-mail: ana_isabele@hotmail.com.

⁴Pós-graduada do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. Orcid: 0000-0003-2579-8242. E-mail: brunapires.fisioterapia@gmail.com.

⁵Pós-graduada do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. Orcid: 0000-0003-2303-9218. E-mail: rafaelanobrega@gmail.com.

⁶Docente da Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba. Orcid: 0000-0002-7466-9933. E-mail: abrahao.farm@gmail.com.

Resumo: Doenças relacionadas às bactérias patogênicas continuam sendo uma ameaça significativa para o corpo humano. Entre as principais bactérias patogênicas causadoras de infecções hospitalares encontramos a *Klebsiella pneumoniae* (KP) que se trata de um bacilo Gram negativo pertencente à microbiota oral, isolado rotineiramente em indivíduos imunodeprimidos, hospitalizados e que contenham uma doença base. Com base nisso o trabalho teve por objetivo realizar uma revisão de literatura sobre os aspectos gerais, virulência e resistência a medicamentos da *Klebsiella pneumoniae*. A KP pode ser categorizada em KP clássica (cKP) e KP *hipervirulenta* (hvKP) de acordo com suas características fenotípicas e genotípicas, esta última tem maior virulência e pode causar doenças infecciosas graves. Pacientes com infecções por *K. pneumoniae* apresentam tendência à disseminação metastática para locais distantes, as apresentações do hvKP são diversas e distintas das infecções causadas pelo cKP. O hvKP causa infecções invasivas adquiridas na comunidade caracterizadas por abscessos hepáticos e infecções metastáticas do pulmão, olhos, sistema nervoso central, sistema musculoesquelético e trato urinário. Os antibacterianos da classe das cefalosporinas e dos carbapenêmicos têm sido a base do tratamento de infecções graves causadas por KP, mas a eficácia tem sido comprometida pela aquisição generalizada de genes que codificam enzimas, como as lactamases de espectro estendido e carbapenemases. Diante disso, revela-se de grande importância a realização de estudos abordando o panorama atual das infecções causadas pela KP e os mecanismos associados ao aumento de sua virulência e resistência aos antimicrobianos, trazendo contribuições vantajosas e estimulando a pesquisa de novas formas farmacêuticas de antimicrobianos.

Palavras-chaves: Bactérias. Infecções bacterianas. Microbiologia.

ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO EM COAUTORIA NA *BRAZILIAN JOURNAL OF BIOLOGY*

DINIZ, A. F. *et al.* Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* (thyme) essential oil against strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus saprophyticus* isolated from meat product. *Brazilian Journal of Biology*, v. 83, p. e275306, 2023.



ISSN 1519-6984 (Print)
ISSN 1678-4375 (Online)

Original Article

Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* (thyme) essential oil against strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus saprophyticus* isolated from meat product

Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus saprophyticus* isoladas de produtos cárneos

A. F. Diniz^{a*}, B. Santos^a, L. M. M. O. Nóbrega^a, V. R. L. Santos^a, W. S. Mariz^a, P. S. C. Cruz^a, R. O. Nóbrega^b, R. L. Silva^b, Á. F. R. Paula^b, J. R. D. A. Santos^b, H. L. F. Pessôa^b and Á. A. Oliveira-Filho^b

^a Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal, Patos, PB, Brasil

^b Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos, João Pessoa, PB, Brasil

Abstract

Meat products represent an important component of the human diet and are a good source of nutrients. Food-borne microorganisms are the main pathogens that cause human diseases as a result of food consumption, especially products of animal origin. The objective of the present research was to verify the antibacterial activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus saprophyticus* isolated from meat products. For this, the analyses of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were performed in microdilution plates. The association of the product with antimicrobials was also studied using disk diffusion. And the anti-adherent activity, which was determined in the presence of sucrose, in glass tubes. Thyme oil showed a strong inhibitory activity against *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. saprophyticus*, with the MIC values ranging from 64 to 512 µg/mL, and bactericidal effect for most strains, with MBC values ranging from 256 to 1024 µg/mL. *T. vulgaris* oil exhibited varied interactions in association with the antimicrobials, with synergistic (41.67%), indifferent (50%) and antagonistic (8.33%) effects. Regarding the anti-adherent activity, the test product was effective in inhibiting the adherence of all bacterial strains under study. Therefore, thyme oil presents itself as an antibacterial and anti-adherent agent against *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *S. saprophyticus*, being a natural product that can represent an interesting alternative in the efforts to combat foodborne diseases.

Keywords: biology, health science, microbiology, medicinal plants.