



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Thially Braga Gonçalves

Atividade antimicrobiana e mecanismos de ação do óleo essencial de *Plectranthusamboinicus* frente a cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*.

Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias

Orientadora

FORTALEZA-CE
FEVEREIRO DE 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Thially Braga Gonçalves

Atividade antimicrobiana e mecanismos de ação do óleo essencial de *Plectranthusamboinicus* frente a cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Profa. Dr^a. Aparecida Tiemi Nagao-Dias

Orientadora

Departamento de Farmácia-UFC

FORTALEZA-CE
FEVEREIRO DE 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

G63a Gonçalves, Thialy Braga.

Atividade antimicrobiana e mecanismos de ação do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* frente a cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae* / Thialy Braga Gonçalves. – 2012.

93 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2012.

Orientação: Prof^ª Dr^ª Aparecida Tiemi Nagao-Dias

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. *Plectranthus*. I. Título.

CDD: 616.9041

THIALLY BRAGA GONÇALVES

Atividade antimicrobiana e mecanismos de ação do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* frente a cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Data da defesa: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias

Doutorado em Microbiologia e Imunologia - Universidade Federal de São Paulo
Orientadora

Dra. Selene Maia de Moraes

Doutorado em Química – Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

Dr. José Galberto Martins da Costa

Doutorado em Química Orgânica - Universidade Regional do Cariri
Examinador

Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior

Doutorado em Farmacologia - Universidade Federal do Ceará
Examinador

*À Deus,
Aos meus pais e irmão,
incentivadores e amigos de todas as horas.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias, minha orientadora, pela oportunidade concedida, por sempre estar disponível para ajudar, pela compreensão, dedicação, amizade e sabedoria na transmissão dos seus conhecimentos, fundamentais para a minha formação acadêmica.

À Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho, Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago e Prof. Dr. Eduardo Bedê Barros pela recepção em seus laboratórios e pelas importantes contribuições neste trabalho.

Aos professores do programa de pós-graduação em Microbiologia Médica pelos conhecimentos transmitidos.

À Carol, secretária do programa de pós-graduação em Microbiologia Médica que sempre está disposta a nos ajudar no que for preciso, por todo o apoio e amizade.

Aos membros da banca, Prof. Dr. José Galberto, Profa. Dra. Selene e Prof. Dr. Helio por terem aceitado gentilmente participar da avaliação desse trabalho.

Aos amigos da pós-graduação, Kylvia, Mariana, Hermínio, Paula, Carlos Eduardo, Erica, Elizabeth, por termos juntos vencidos tantas disciplinas, pela amizade e por todo o apoio ao longo desses dois anos.

À amiga Paula Brito pela amizade, constante apoio e incentivo nas horas difíceis.

Aos amigos do laboratório de Bacteriologia Catarina, Janice, Camila, Nayara, Jamila, Bruno, Olavo pela união, amizade, paciência, por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas.

Aos amigos e agregados do Laboratório de Imunologia, Fabrícia, João Carlos, Paula, Camila, Fábio, Luciana, Alba, Tatiane, Natalia, Evaldo, Evandro, Rafael, pela amizade, companheirismo, bons momentos compartilhados e colaborações.

À bolsista Milena, pela amizade e dedicação na execução dos experimentos.

Ao colega Thiago do laboratório de microscopia avançada, pela dedicação e colaboração na obtenção das imagens no Microscópio de Força Atômica.

Aos amigos Leoncio e Roberto do laboratório de síntese orgânica por todo o apoio na realização da etapa na química.

À minha família, meus pais, Gonçalves e Vilma, irmão, Thiago, avó, Zélia, a Yuri e D. Laice, pelo apoio, incentivo, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis e pela compreensão por não poder estar presente em todos os momentos.

A Apiano Moraes pela paciência em ajudar, pelo constante incentivo, companheirismo, por todos os ensinamentos técnicos, científicos e de vida.

Aos ex-vizinhos e amigos Apiano, Jota, Erneron, Argus, Max, Pablo, Marcella, Munique pela amizade, por tornarem minha vida em Fortaleza muito melhor, meus dias mais leves e fáceis de suportar.

Esse trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições e parceiros:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Ceará (FUNCAP/PPSUS).

Laboratório de Bacteriologia – Departamento de Patologia e Medicina Legal (UFC).

Laboratório de Síntese Orgânica – Departamento de Química (UFC).

Laboratório de Microscopia Avançada – Departamento de Física (UFC).

“O ser humano tem a necessidade de conquistar por natureza. Sofrer, lutar, perder, ganhar, suar, pra no final sorrir. Tempos sem descanso, sem família, sem horário, sem amigos, para chegar na vitória com orgulho e paz. Olhar para trás e lembrar que o que nos impulsionou foi o sonho de um dia conquistar. E conquistamos apenas a permissão de querer conquistar muito mais.”

André de Souza Baptista

RESUMO

O trabalho descreve o primeiro estudo sobre a atividade antimicrobiana e mecanismos de ação de concentrações sub-inibitórias e inibitórias do óleo essencial das folhas de *Plectranthus amboinicus* contra uma cepa padrão de *Klebsiella pneumoniae* e cepas obtidas de isolados clínicos multirresistentes. A concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), a taxa de morte e o efeito do pH na ação do óleo essencial foram analisadas através de testes de microdiluição em microplacas. Concentrações sub-inibitórias e inibitórias do óleo essencial foram testadas para verificar sua ação sobre permeabilidade da membrana, expressão de cápsula, atividade da urease e morfologia celular de *K. pneumoniae*. A CIM e CBM do óleo essencial foram de $0,09 \pm 0,01\%$ e resultou notavelmente na inibição completa do crescimento bacteriano após 2 horas, quando as bactérias foram expostas a duas vezes a CIM do óleo essencial. A melhor CIM foi encontrada quando o pH neutro ou alcalino foi usado. Captação de Cristal violeta foi considerada significativa quando o dobro da CIM do óleo essencial foi usado ($p < 0,05$). Inibição da atividade da urease foi observada em todas as concentrações sub-inibitórias testadas, quando comparada ao grupo não tratado ($p < 0,001$). Verificou-se ainda alteração na expressão da cápsula e alterações na membrana, verificadas pelas técnicas de Anthony e por microscopia de força atômica, respectivamente.

Palavras-chave: Multirresistência, atividade antimicrobiana, *Klebsiella pneumoniae*, *Plectranthus amboinicus*.

ABSTRACT

This work describes the first study about the antimicrobial activity and mechanisms of action of the subinhibitory and inhibitory concentrations of the essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus* against standard strain of *Klebsiella pneumoniae* and multiresistant clinical isolates of the bacterium. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC), the rate of killing and the pH sensitivity of the essential oil were determined through microplate-microdilution tests. Subinhibitory and inhibitory concentrations of *Plectranthus amboinicus* essential oil were tested in order to check their action on *K. pneumoniae* membrane permeability, capsule expression, urease activity and cell morphology. The MIC and MBC of the essential oil were $0.09 \pm 0.01\%$ and resulted remarkably in complete inhibition of the bacterial growth after 2 hours, when the bacteria were exposed to twice the MIC of the essential oil. A better MIC was found when neutral or alkaline pH broth was used. Cristal violet uptake which represented altered permeability was considered to be significant when twice the MIC of the essential oil was used compared to the untreated group ($p < 0.05$); Reduction of the urease activity could be found when all the subinhibitory concentrations were tested compared to the untreated group ($p < 0.001$). It was observed as well alteration on the capsule expression and on the membrane, which could be demonstrated by the Anthony's method and atomic force microscopy, respectively.

Keywords: Multi-resistance, antimicrobial activity, *Klebsiella pneumoniae*, *Plectranthus amboinicus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de <i>K. pneumoniae</i> obtida por microscopia de força atômica (MFA).	18
Figura 2. Colônias de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em MacConkey	20
Figura 3. Imagem da <i>K. pneumoniae</i> submetida à coloração <i>Anthony's capsule</i> onde a capsula mostra-se não corada, refringente.	21
Figura 4. Mecanismos de resistência de <i>K. pneumoniae</i>	23
Figura 5. Sítios bacterianos de ação dos compostos naturais.	29
Figura 6. Análise filogenética do gênero <i>Plectranthus</i> . As linhas contínuas representam grupos que possuem larga utilização popular e as linhas tracejadas indicam grupos de pouca importância.	30
Figura 7. Classificação botânica de <i>Plectranthus amboinicus</i>	31
Figura 8. Estruturas químicas de Carvacrol e Timol.	33
Figura 9. Sistema do tipo Clevenger	41
Figura 10. Fluxograma para obtenção e análise do óleo essencial.	41
Figura 11. Esquema da determinação da CIM e CBM de <i>Plectranthus amboinicus</i> contra <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
Figura A - 1 Composição química do óleo essencial das folhas de <i>P. amboinicus</i> realizada por cromatografia gasosa em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM) Shimadzu, modelo (QP5050A). 66	
Figura A - 2 Espectro de massas do 4-terpineol.	66
Figura A - 3 Espectro de massas do carvacrol.	67
Figura A - 4 Espectro de massas do β -cariofileno.	67
Figura A - 5 Espectro de massas do α -Bergamoteno.	68
Figura A - 6 Espectro de massas do oxido de cariofileno.	68
Figura A - 7 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima de <i>P. amboinicus</i> para <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
Figura A - 8 Efeito do pH na ação do óleo essencial de <i>P. amboinicus</i> para <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i>	70
Figura A - 9 Ação bactericida do óleo essencial de <i>P. amboinicus</i> contra <i>Enterococcus faecalis</i>	70
Figura A - 10 Ação bactericida do óleo essencial de <i>P. amboinicus</i> contra <i>Enterococcus faecium</i>	71
Figura A - 11 Ação bactericida do óleo essencial de <i>P. amboinicus</i> contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71
Figura A - 12 Captação de cristal violeta por <i>Enterococcus faecalis</i> previamente incubado com óleo essencial de <i>P. amboinicus</i>	72
Figura A - 13 Captação de cristal violeta por <i>Enterococcus faecium</i> previamente incubado com óleo essencial de <i>P. amboinicus</i>	72
Figura A - 14 Captação de cristal violeta por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> previamente incubado com óleo essencial de <i>P. amboinicus</i>	73
Figura A - 15 Imagem de <i>E. faecalis</i> obtida através de Microscopia de Força Atômica (MFA). Representado por (a) Controle; (b) 1X CIM e (c) 2X CIM.	73
Figura A - 16 Identificação bacteriana manual da família Enterobacteriaceae	75
Figura A - 17 Identificação bioquímica simplificada	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Características morfológicas e bioquímicas de *K. pneumoniae* 6

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela de resistência a drogas em isolados clínicos de *K. pneumoniae*.43

LISTA DE ABREVIATURAS

2-MPA – Ácido 2-mer-captopropiônico

AmpC – Betalactamase classe C

ATCC- American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CG/EM – Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de massa

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CPS – Polissacarídes capsulares

DMSO – Dimetilsufóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ESBL – Betalactamase de espectro ampliado

H₂S – Ácido sulfídrico

HCl – Ácido Clorídrico

ISO – International Organization for Standardization

KCN – Cianeto de Potássio

KPC – Carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae*

LPS – Lipopolissacarídeo

MBL – Metalobetalactamase

MFA – Microscópio de Força Atômica

Na₂SO₄ – Sulfato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

PBP- Proteína de ligação às penicilinas

PBS – Tampão fosfato salina

RNA – Ácido Ribonucleico

SENTRY – Programa de vigilância epidemiológica e resistência antimicrobiana

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VP – Voges-Proskauer

VRE – *Enterococcus* resistente a vancomicin

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
Infecções hospitalares.....	16
Multirresistência.....	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> : patógeno emergente	17
Plantas Medicinais como alternativa de novos medicamentos.....	26
Óleos essenciais	27
<i>Plectranthus amboinicus</i>	29
JUSTIFICATIVA.....	36
OBJETIVOS	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
Coleta do material botânico	40
Obtenção do óleo essencial	40
Análise do óleo essencial.....	42
Verificação da concentração inibitória mínima (CIM)	43
Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	45
Cinética de inibição do crescimento bacteriano.....	46
Ensaio do pH.....	46
Ensaio do Cristal Violeta.....	46
Efeito de níveis de Sub-CIM e CIM de <i>P. amboinicus</i> na atividade da Urease	47
Efeito de níveis de Sub-CIM e CIM de <i>P. amboinicus</i> na expressão da cápsula.....	47
Microscopia de Força Atômica.....	48
Análise estatística.....	48
ARTIGO	Error! Bookmark not defined.
CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS	
Análise cromatográfica do óleo essencial de <i>Plectranthus amboinicus</i>	66
Outros resultados.....	69
Identificação bacteriana manual da família Enterobacteriaceae.....	75
Identificação bioquímica simplificada.....	76
Preparo do óleo essencial, Meios de Cultura e Reagentes	77

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Infecções hospitalares

Pacientes internados em instituições de saúde estão expostos a uma variedade de microrganismos patogênicos, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTI) onde é comum o uso de antimicrobianos de amplo espectro. O Ministério da Saúde define que as infecções hospitalares são aquelas adquiridas especificamente após admissão do paciente em unidade hospitalar e que se manifestam durante a internação ou após a alta, quando relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (ABBEG ; SILVA, 2011).

No Brasil, 5 a 15% dos pacientes hospitalizados e 25 a 35% dos pacientes admitidos em UTIs adquirem infecção hospitalar, sendo considerada a quarta causa de mortalidade. Sabe-se que as doenças infecciosas são responsáveis por 17 a 20 milhões de óbitos por ano em todo o mundo, além disso, cerca de 10 milhões adquirem infecção hospitalar e, destes, quase 300 mil morrem (BUCHALLA; WALDMAN; LAURENTI, 2003; APECIH, 2005).

Multirresistência

Não se tem uma definição universalmente aceita para microrganismos multirresistentes, podendo ser baseada, a depender do enfoque, quanto à epidemiologia, microbiologia e aspectos clínicos. No entanto, pode ser definida como aqueles microrganismos classicamente hospitalares que apresentam resistência a uma ou mais classe de antimicrobianos de uso habitual. Essa resistência deve ter relevância clínica e epidemiológica com possibilidade de surtos ou transmissão de seu mecanismo de resistência (LOPEZ-PUEYO, 2011).

O aumento da frequência de infecções causadas por esses microrganismos é uma realidade que tem preocupado a classe científica em todo o mundo. De acordo com resultados do Programa de vigilância epidemiológica e resistência antimicrobiana da América Latina e Brasil (SENTRY), os bastonetes Gram-negativos não fermentadores (*Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*) multirresistentes e as *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Proteus mirabilis*) produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) constituem o principal problema de

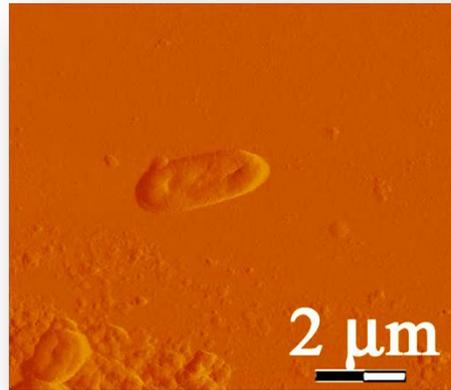
farmacorresistência nesses locais; da mesma forma, adquirem importância os cocos Gram-positivos, *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina/meticilina. As manifestações clínicas das infecções são semelhantes às causadas pelas cepas sensíveis, no entanto, as opções terapêuticas ainda são extremamente limitadas (GUIDELINE ; *et al.*, 2006; PATEL ; *et al.*, 2008; COSGROVE, 2006).

A prevalência de microrganismos multirresistentes varia temporal e geograficamente e também está relacionada com o tipo e nível de cuidados, como por exemplo, nas UTIs, onde há uma maior prevalência de infecções causadas por microrganismos multirresistentes. A frequência dessas infecções, embora não seja elevada, pode causar doenças graves e de alta mortalidade. Essa frequência tende a aumentar como ocorreu, por exemplo, com cepas de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) que correspondiam a 1% dos isolamentos em hospitais em 1990 nos EUA; em 1997 aumentou significativamente, chegando a 28,5% em 2003. Vários fatores podem ter contribuído para este aumento de incidência, tais como, pressão seletiva exercida pela exposição a agentes antimicrobianos em hospitais e na comunidade, adesão a práticas inadequadas de controle de infecção, ou combinação de ambos fatores (GUIDELINE ; *et al.*, 2006).

Klebsiella pneumoniae: patógeno emergente

A grande variedade e gravidade das síndromes infecciosas ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae* (**Figura 1**), bem como as elevadas taxas de resistência desse microrganismo encontradas em muitos hospitais, colocou-a como um patógeno de grande importância a nível de Saúde Pública (BEHAR, 2004).

Figura 1. Imagem de *K. pneumoniae* obtida por microscopia de força atômica (MFA).



(Fonte própria)

TAXONOMIA E CLASSIFICAÇÃO

A família Enterobacteriaceae é constituída por um grupo heterogêneo de bactérias Gram-negativas, nesse grupo encontra-se a tribo Klebsielleae. Os microrganismos dessa família são encontrados em toda parte, em plantas, água, solo e no trato intestinal humano. Algumas espécies estão facilmente distribuídas no meio ambiente e ocupam uma ampla gama de hospedeiros, enquanto outras espécies possuem nichos limitados. Nessa família estão inclusos gêneros clinicamente importantes como *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia* e *Enterobacter*. Os microrganismos pertencentes a essa família são responsáveis por um grande número de enfermidades causadas por bactérias Gram-negativas, tais como, pneumonia, septicemia, meningite, infecção do trato urinário e infecções intestinais (BRENNER; STEIGERWALT; FANNING, 1972; JAWETZ, 2009; KONEMAN, 2008).

O gênero *Klebsiella* foi assim descrito em homenagem a Edwin Klebs, um microbiologista alemão do final do século XIX. O gênero era classificado tradicionalmente, a partir de análises bioquímicas, em *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis*. Entretanto, com o advento de métodos de hibridização do DNA, ficou demonstrado que aquelas espécies bacterianas apresentavam percentuais elevados de homologia na sequência de DNA, o que demonstrou que eram representantes de uma única espécie, *K. pneumoniae*. Esta passou a ser classificada em três subespécies: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* e *K. pneumoniae* subsp. *rhinocleromatis*. Estudos moleculares permitiram a descrição de outras espécies, tais como, *K. oxytoca*, *K. ornithinolytica* e *K.*

planticola, estas últimas anteriormente designadas como *K. trevisanii* e *K. terrigena* (KONEMAN, 2008).

Klebsiella pneumoniae foi inicialmente identificado por Carl Friendlander em 1882, a partir de amostras de pulmão de pacientes que foram a óbito devido à pneumonia. Em decorrência de sua descoberta, a bactéria era conhecida como bacilo de Friendlander, tendo sido responsável pela causa de pneumonias graves e fatais (KONEMAN, 2008).

Estudos sobre a análise comparativa das sequências dos genes que codificam a subunidade β da RNA polimerase bacteriana, realizados por Drancourt et al. (2001), confirmaram que o gênero *Klebsiella* é heterogêneo, sendo dividido em três grupos filogenéticos: Grupo I (*K. pneumoniae* subesp. *pneumoniae*, *rhinoscleromatis* e *ozaenae*; e *K. granulomatis*); Grupo II (*K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. trevisanii* e *K. terrigena*); Grupo III (*K. oxytoca*). Ainda baseado nesse estudo, foi sugerida a divisão do gênero *Klebsiella* em dois, ou seja, *Klebsiella* e *Raoultella*, deixando *K. oxytoca* como táxon monofilético (DRANCOURT; BOLLET; CARTA, 2001).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Cepas de *K. pneumoniae* apresentam-se em ágar MacConkey sob a forma de colônias brilhantes, elevadas, com diâmetros de 3 a 4 mm, de aspecto mucoide e coloração rósea (**Figura 2**). Quando submetidas à coloração de Gram, mostram-se como bacilos Gram-negativos grandes isolados, em cadeias curtas ou aos pares. Apresentam cápsula (**Figura 3**) que mede 0,3 a 1 μ m de diâmetro e bacilo com comprimento variando de 0,6 a 6,0 μ m de comprimento (KONEMAN, 2008; JAWETZ, 2009). Outras características de identificação de *K. pneumoniae* encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1: Características morfológicas e bioquímicas de *K. pneumoniae*.

Características morfológicas e bioquímicas
Não esporuladas;
Imóveis;
Anaeróbias facultativas, mas crescem melhor em condições aeróbias,
Fermentadoras de glicose;
Não produtoras de ácido sulfídrico (H ₂ S);
Crescem em meios contendo cianeto de potássio (KCN positiva);
Podem utilizar o citrato como única fonte de carbono;
Podem produzir butilenoglicol como produto final da fermentação de glicose (VP positiva);
Podem ou não formar gás a partir da fermentação de glicose;
Realizam hidrólise da ureia.

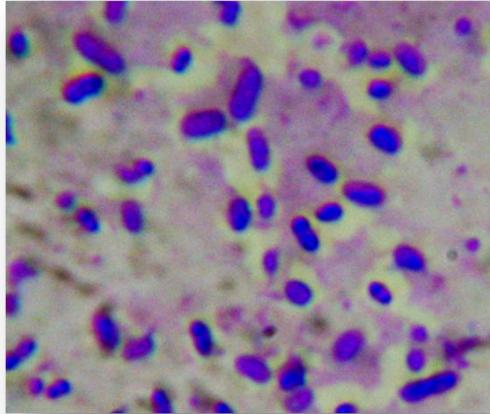
(Fonte: JAWETZ, 2009).

Figura 2. Colônias de *Klebsiella pneumoniae* em MacConkey .



(Fonte própria)

Figura 3. Imagem da *K. pneumoniae* submetida à coloração *Anthony's capsule* onde a capsula mostra-se não corada, refringente.



(Fonte própria)

INFEÇÕES CAUSADAS POR *K. pneumoniae*

A maioria das infecções causadas por *K. pneumoniae* estão associadas aos serviços de saúde ou a pacientes imunocomprometidos e podem causar uma variedade de síndromes clínicas, dentre elas, as mais comuns são infecções do trato urinário, ferida operatória, pneumonia, infecção do cateter vascular, do trato biliar, peritonites, meningites e bacteremias (SCHWABER ; *et al.*, 2006; BRATU ; *et al.*, 2005; MARCHAIM; NAVON-VENZIA; SCHWABER, 2008; NOGUEIRA ; *et al.*, 2009).

MECANISMOS DE VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE DE *K. pneumoniae*

Os fatores de virulência de *K. pneumoniae* decorrem da presença de cápsula, adesinas, lipopolissacarídeos (LPS), sideróforos e da capacidade de produzir ureases (SILVEIRA ; *et al.*, 2010).

A cápsula, composta de polissacarídeos, possui 77 sorogrupos distintos, é responsável pelo crescimento mucoide em placas de ágar, e apresenta-se em camada espessa de estruturas fibrilares que protege a bactéria da fagocitose por leucócitos polimorfonucleares, monócitos/macrófagos e de fatores do soro, como a fração C3b do complemento (CHHIBER; AGGARWAL; YADAV, 2003).

Outras estruturas relevantes são *pili* do tipo 1 e 3, além de adesinas envolvidas na primeira etapa da colonização bacteriana. Os *pili* (ou fímbrias) são responsáveis pela ligação ao muco, ao epitélio urogenital, intestinal e respiratório. Os sideróforos atuam facilitando a captação de ferro livre, essencial para sua sobrevivência no hospedeiro (GUPTA ; *et al.*, 2003; CHHIBER; AGGARWAL; YADAV, 2003).

A produção de urease se apresenta como um importante fator de virulência. *K. pneumoniae* é capaz de utilizar uréia como fonte de nitrogênio para o crescimento devido à sua capacidade de hidrolisar uréia em amônia e dióxido de carbono utilizando urease citoplasmática. A liberação de amônia, agente fortemente alcalino, também pode ser um fator de lesão tecidual importante para a manutenção da infecção (MARONCLE; RICH; FORESTIER, 2006).

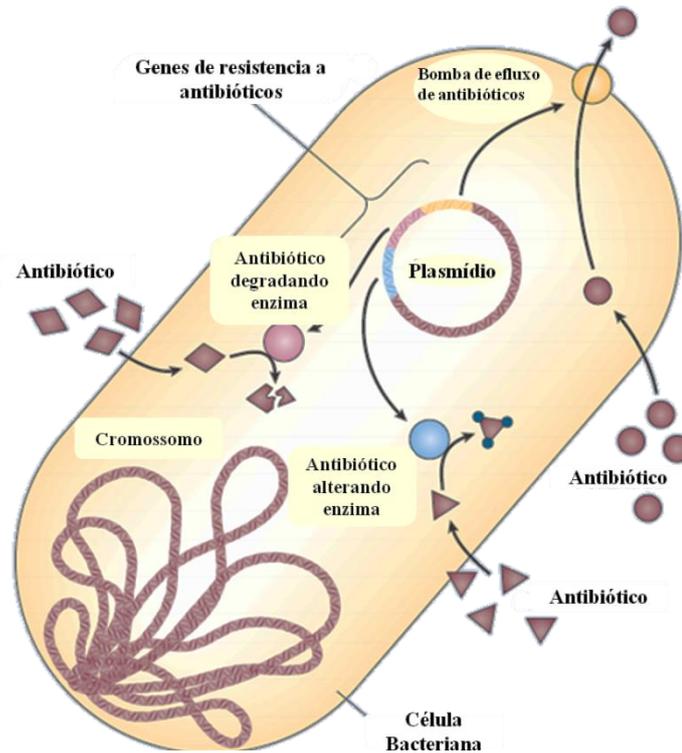
Outro fator de patogenicidade também muito importante, é a capacidade de formação de biofilme. Biofilmes são populações bacterianas que se distribuem em várias camadas e se incorporam a uma matriz polimérica extracelular aderida a superfícies bióticas ou abióticas (APARNA ; YADAV, 2008). O desenvolvimento de biofilmes nem sempre estão correlacionados com virulência, mas favorecem as cepas patogênicas capazes de produzi-la (LAVENDER; JAGNOW; CLEGG, 2004).

RESISTÊNCIA DE *K. pneumoniae* A FÁRMACOS

A possibilidade de adaptação das bactérias à presença de antimicrobianos é anterior ao advento da penicilina. Essa capacidade de adaptação a ambientes nocivos foi ignorado por séculos pela população e pelos profissionais de saúde. Como resultado dessa negligência e do uso abusivo dos antimicrobianos, as bactérias desenvolveram vários mecanismos de sobrevivência aos diversos tipos de ambientes (LEVY ; MARSHALL, 2004).

Essa capacidade de desenvolvimento de mecanismos de resistência pode dificultar o desenvolvimento de novos antimicrobianos. Entre os mecanismos de resistência que *K. pneumoniae* utiliza, podem ser citadas alteração do sítio alvo de ação, alteração da permeabilidade da membrana externa bacteriana e produção de enzimas promotoras de resistência (ver **Figura 4**) (LEVY ; MARSHALL, 2004).

Figura 4. Mecanismos de resistência de *K. pneumoniae*.



(Fonte: LEVY; MARSHALL, 2004).

Entre as enzimas promotoras de resistência, as mais conhecidas são as betalactamases. Até o momento, as betalactamases de interesse clínico e que apresentam espectro de ação sobre os fármacos betalactâmicos são quatro: betalactamase de espectro estendido (ESBL), carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae* (KPC), metalobetalactamase (MBL) e betalactamase classe C (AmpC).

As ESBLs são enzimas produzidas por bacilos Gram-negativos que hidrolisam a cadeia oximino-betalactâmica, exceto carbapenêmicos e cefamicinas. Os genes que as codificam estão localizados em plasmídeos, sendo que a ação das enzimas pode ser inibidas *in vitro*, quando se utiliza inibidores de betalactamases, como ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam (PATERSON ; BONOMO, 2005).

A enzima KPC foi descoberta nos Estados Unidos em 2001, é predominantemente encontrada em *K. pneumoniae*, mas já foi relatada em *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Pseudomonas* sp. Do ponto de vista funcional, ela pertence à classe das ESBLs, no entanto a

KPC além de hidrolisar os carbapenêmicos, também é capaz de inativar os antibióticos do grupo penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Possui ainda a capacidade de hidrolisar todas as cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e aztreonam. É comum entre cepas que apresentam genes para a produção de KPC, a presença de genes de resistência a outros antibióticos como os macrolídeos e aminoglicosídeos (HIRSCH ; TAM, 2010; PATERSON ; BONOMO, 2005; BERTRAND ; *et al.*, 2006).

Outra carbapenemase importante é a MBL, que degrada os betalactâmicos, exceto aztreonam, mas pode ser inibida por agentes quelantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) (PATERSON ; BONOMO, 2005).

Há ainda a AmpC, que é capaz de hidrolisar penicilinas, monobactâmicos e até cefalosporinas de terceira geração. Nas últimas duas décadas, a transferência de plasmídeos contendo o gene da betalactamase classe C tem sido frequentemente documentada. Nesse caso, tal resistência pode não ser identificada no antibiograma. Resultados de estudos epidemiológicos têm mostrado crescimento do número de isolados bacterianos com esse tipo de mecanismo de resistência (PITOUT, 2008; ROSSI ; ANDREAZZI, 2005).

TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *K. pneumoniae*

Os antibióticos mais utilizados para tratar infecções por *K. pneumoniae* são as cefalosporinas de espectro ampliado. Entretanto, com o advento de espécies produtoras de ESBL, houve um aumento da resistência as cefalosporinas, tornando difícil o tratamento dessas infecções. Os antimicrobianos mais eficazes para *K. pneumoniae* têm sido a ciprofloxacina e os carbapenêmicos (BRADFORD, 2001; KANG ; *et al.*, 2004; ULLAH ; MALIK, 2009).

A ciprofloxacina é constituída por ácido 3-quinolino-1-ciclopropil-6-flúor-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil) carboxílico, sendo uma quinolona de 3ª geração, e possui ação contra bactérias Gram negativas. Seu mecanismo de ação resulta da inibição da topoisomerase bacteriana do tipo II (DNA girase) e topoisomerase IV, necessárias para a replicação, transcrição, reparo e recombinação do DNA bacteriano. A resistência bacteriana ocorre rapidamente quando o fármaco é utilizado em esquemas de monoterapia, através de três mecanismos principais, ou seja, através de mutação no gene que codifica a enzima DNA girase, ou por alteração na membrana celular da bactéria, tornando-a impermeável às

fluoroquinolonas. Este tipo de ação resulta em redução do fármaco para o interior da célula ou no aumento da expulsão do fármaco para fora da célula bacteriana através de bombas de efluxo. Os mecanismos de resistência que inativam as penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclinas não interferem na atividade antibacteriana da ciprofloxacina e não se conhece resistência cruzada entre ciprofloxacina e outros antimicrobianos (GOODMAN ; GILMAN, 2005; JAWETZ, 2009).

Os antibióticos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) são betalactâmicos de amplo espectro, derivados da tienamicina. Possuem considerável estabilidade diante das betalactamases, incluindo as de amplo espectro (ESBL), dessa forma, são considerados fármacos de reserva, sendo empregados como último recurso no tratamento de infecções hospitalares causadas por bactérias Gram-negativas resistentes aos demais betalactâmicos ou outros antibacterianos (JAWETZ, 2009; NEVES ; *et al.*, 2011).

A resistência a carbapenêmicos pode ocorrer pela perda de porinas, pela presença de proteínas de ligação às penicilinas (PBP) com baixa afinidade para carbapenêmicos, superexpressão de bombas de efluxo e hidrólise enzimática. Entre os mecanismos responsáveis pela resistência ao imipenem, a impermeabilidade da membrana, devido à perda de porinas ou à superexpressão das bombas de efluxo, que confere uma resistência adicional a várias classes de antibióticos, como resultado de um efeito cascata gerado por múltiplos mecanismos de resistência inter-relacionados (JAWETZ, 2009; NEVES ; *et al.*, 2011).

EPIDEMIOLOGIA DE *K. pneumoniae*

Espécies do gênero *Klebsiella* podem ser encontradas na natureza, em fezes humanas e de outros animais, uma vez que são colonizadores naturais do trato gastrointestinal de humanos e animais. Em humanos, *K. pneumoniae* faz parte da microbiota natural da nasofaringe e do trato gastrointestinal. Além disso, sobrevivem mais tempo nas mãos, pele e objetos inanimados, quando comparado as demais espécies da família Enterobacteriaceae. Embora este microrganismo faça parte da microbiota normal, ele pode causar diversas doenças, como pneumonia, infecções do trato urinário, diarreia, bacteremia e infecções de feridas cirúrgicas (KONEMAN, 2008).

Inicialmente, *K. pneumoniae* foi considerada uma das principais causas de pneumonia adquirida na comunidade. Ao longo dos anos, o número de casos de pneumonia atribuído à *K. pneumoniae* diminuiu, no entanto, persiste como patógeno oportunista, acometendo

principalmente pacientes imunocomprometidos. É responsável por 3 a 8% das infecções hospitalares, cujas taxas de mortalidade são bastante elevadas (LEAVITT ; *et al.*, 2009).

Dentro de uma perspectiva mundial, um estudo realizado em Unidades de Terapia Intensiva, Enfermaria de Oncologia e Hematologia da Malásia, detectou o gênero *Klebsiella* spp. com maior frequência (36,5%) dentre os patógenos isolados, seguido de *Pseudomonas* spp. (20%) e *E. coli* (17,5%). Em outro estudo realizado em Unidades de Terapia Intensiva Neonatais, Pediátricas ou Oncológicas na Arábia Saudita, *K. pneumoniae* foi um patógeno frequentemente encontrado entre os anos de 1997 e 1999, representando 15-17% dos agente etiológicos de infecções hospitalares (ARIFIN ; *et al.*, 2004; BILAL ; GEDEBOU, 2000).

Dados do Programa de Vigilância a Antimicrobianos em Hospitais Brasileiros (SENTRY) mostraram que a frequência de *K. pneumoniae* em bacteremias e pneumonias foi de 12,5% e 13,5%, respectivamente. Em um estudo realizado com infecções de úlceras de pacientes diabéticos no Ceará, verificou-se que *K. pneumoniae* foi frequentemente encontrada (ANDRADE ; *et al.*, 2008).

Plantas Medicinais como alternativa de novos medicamentos

A utilização de plantas medicinais é uma prática muito comum de terapêutica desde os primórdios, onde foram sendo acumuladas informações passadas de geração em geração. No século XX, o surgimento dos antibióticos produzidos por fermentação microbiana, aliado à síntese de fármacos pela indústria farmacêutica, logo após a II Guerra Mundial, fez com que houvesse declínio no uso de plantas medicinais e investimentos de fármacos de origem vegetal (MONTANARI ; BOLZANI, 2001). No período pós-guerra, com a grande utilização de fármacos sintéticos, o uso de plantas medicinais ganhou bastante espaço como tratamento alternativo e, desde então, tem se intensificado com o aumento de estudos científicos relacionados com o tema, especialmente no Brasil (MONTANARI ; BOLZANI, 2001).

O Brasil detém a maior biodiversidade, ou seja, 67% das espécies vegetais do mundo encontram-se nas florestas tropicais brasileiras, cuja área corresponde a 7% da superfície da terra. Em nosso meio, o conhecimento do uso de plantas medicinais é amplo, há tecnologia para processar tal conhecimento e, conseqüentemente, grande potencial para expansão de pesquisas na área (BRASIL, 2006). Baseado nisso e fundamentado na Portaria nº 971 de 2006, foi estabelecida a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada através do decreto Nº 5.813, cujas diretrizes para o desenvolvimento de ações garantem o

acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As plantas aromáticas como possuem óleos voláteis ou essenciais têm sido usadas como flavorizantes, aromatizantes, além de seu uso medicinal (LUKHOBBA; SIMMONDS; PATON, 2006). Cada planta é constituída de inúmeros princípios ativos que podem agir de forma sinérgica, de maneira que o resultado dessa ação conjunta é representativo. É importante ressaltar que o tratamento a base de fitoterápicos requer, como qualquer outro tipo de tratamento, uma avaliação correta da aplicabilidade da planta sobre uma determinada patologia (BURT, 2004).

Óleos essenciais

Óleos essenciais de acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO), no documento 9235 de 1997, constituem uma mistura complexa de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES, 2007).

A constituição química dos óleos essenciais varia com a hora e época da coleta do material botânico, região geográfica, condições do solo e com o método de extração. Podem ser constituídos de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos com enxofre. Os óleos essenciais, são empregados nas indústrias de perfumaria, alimentos e bebidas, e também em aplicações terapêuticas e são denominados essenciais pelo fato de apresentarem um aroma agradável (SIMÕES, 2007).

Os óleos essenciais são geralmente extraídos por destilação podendo também ser extraídos com o uso de solventes (VAGIONAS ; *et al.*, 2007). Possuem aspecto oleaginoso a temperatura ambiente e são voláteis, o que os diferencia dos óleos fixos que são misturas lipídicas obtidas normalmente de sementes (soja, girassol, mamona). São solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter, sendo também designados por óleos etéreos ou do latim, *aetheroleum*. Apresentam baixa solubilidade em água, mas suficiente para que ocorra a formação de hidrolatos, que consistem de uma mistura de água com elementos bioativos e aromáticos (resultantes do processo de extração de um óleo essencial por arraste a vapor e hidrodestilação). Os hidrolatos podem ser parcialmente responsáveis pelas propriedades terapêuticas da planta (BURT, 2004; SIMÕES, 2007).

Os óleos essenciais possuem um ou dois componentes majoritários ativos em concentrações variáveis, como por exemplo o tomilho possui timol (até 60% do total de componentes encontrados nos óleos essenciais), canela possui cinamaldeído (até 75%), orégano, timol (até 64%) e malvarisco, carvacrol (até 80%) (BURT, 2004; GONÇALVES ; *et al.*, 2010).

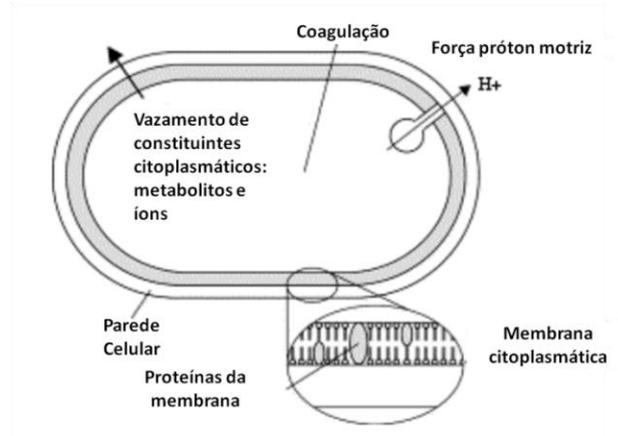
AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais representam um grupo de antimicrobianos naturais, tradicionalmente utilizados na prevenção da contaminação de alimentos e são também avaliados para uso em diversos produtos como cimentos dentários, antissépticos e suplementos alimentares (BURT, 2004; SIMÕES, 2007).

Muitos estudos acerca das propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais foram realizados, no entanto os mecanismos de ação destes e de seus constituintes ainda são pouco explorados (POZZATTI ; *et al.*, 2008). Alguns estudos têm mostrado ações dos óleos essenciais sobre a membrana citoplasmática, desestabilização da força próton-motriz fluxo, de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo celular (SILVA ; FERNANDES JÚNIOR, 2010; BURT, 2004) (**Figura 5**).

Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos podendo alguns sítios ser afetados devido a outros mecanismos (BURT, 2004). Há ainda estudos que sugerem que a maioria dos óleos essenciais atua através de modificações na estrutura da parede celular do microrganismo, promovendo alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática através de modificação no gradiente de íons de hidrogênio (H⁺) e potássio (K⁺), o que faz com que haja perda do controle quimiosmótico da célula e conseqüente morte do microrganismo. Acredita-se que os compostos fenólicos são os principais responsáveis por essas ações e foi demonstrado que timol e carvacrol acumulam-se na membrana celular de *P. aeruginosa* e *S. aureus* aumentando em 90% a permeabilidade celular desses microrganismos (DORMAN ; DEANS, 2000; LAMBERT ; *et al.*, 2001).

Figura 5. Sítios bacterianos de ação dos compostos naturais.



(Fonte: SILVA;FERNANDES JUNIOR, 2010).

Plectranthus amboinicus, por se tratar de uma planta rica em metabólitos com potenciais ações antimicrobianas e anti-inflamatórias, tem sido alvo de estudos, embora de uma forma um pouco escassa (RICE ; *et al.*, 2011).

Plectranthus amboinicus

CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

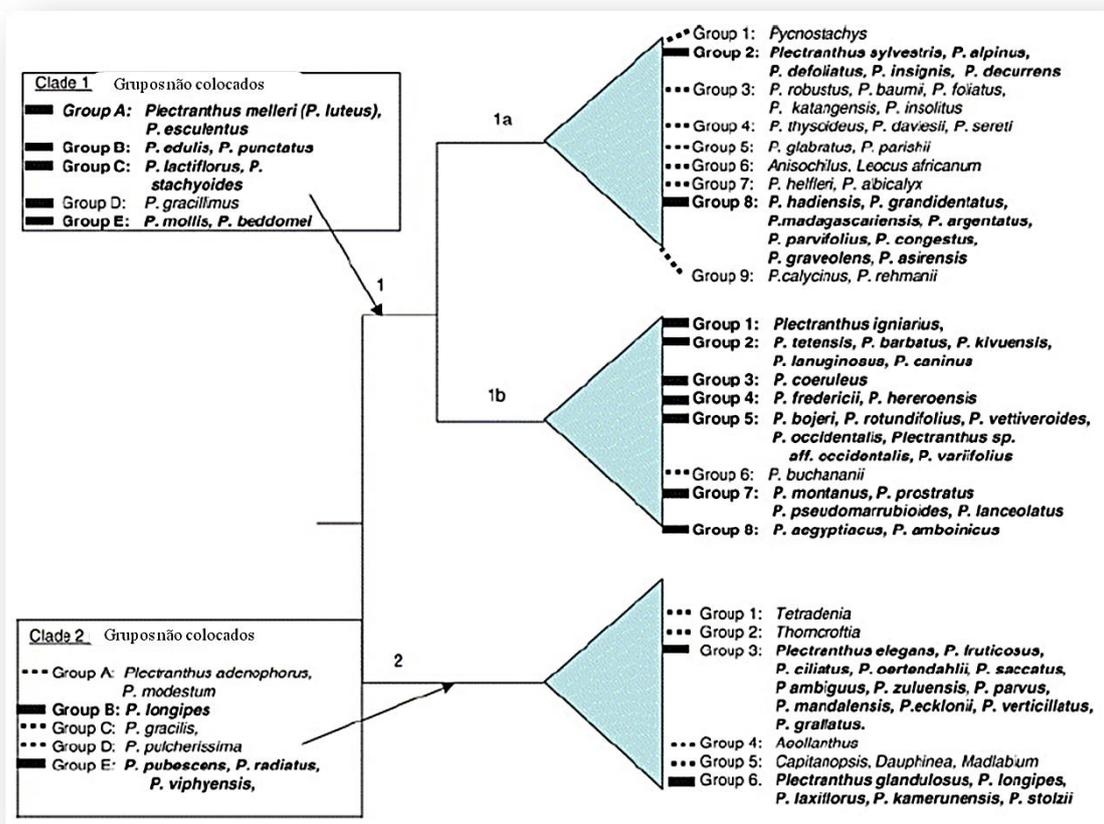
Plectranthus amboinicus é classificada taxonomicamente dentro da família Lamiaceae, subfamília Nepetoideae e tribo Ocimeae (LUKHOBA, SIMMONDS, PATON, 2006). Esta família possui diversos gêneros tais como hortelã (*Mentha*), sálvia (*Salvia*), manjerição (*Ocimum*) e *Plectranthus* sendo que este último contém cerca de 350 espécies e pode ser encontrado na Ásia, África e Austrália (HARLEY ; REYNOLDS, 1992).

O gênero *Plectranthus* têm importância econômica por ser bastante utilizada em ornamentação, culinária e medicinal (LUKHOBA; SIMMONDS; PATON, 2006). As espécies mais utilizadas na medicina tradicional em todo o mundo são: *P. amboinicus*, *P. vettiveroides*, *P. barbatus*, *P. mollis*, *P. coetsa* e *P. incanus*, e no estado do Ceará, têm sido utilizadas principalmente *P. amboinicus* Andr., *P. barbatus* (Lour) Spreng, *P. ornatus* e *P. grandis*. Estas espécies apresentam capacidade de síntese de uma variedade de metabólitos

secundários, como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e fenólicos, alguns com propriedades biológicas comprovadas (LUKHOBÁ; SIMMONDS; PATON, 2006).

As 62 espécies de *Plectranthus* foram mapeadas através de estudo filogenético baseado nas sequências de DNA (LUKHOBÁ; SIMMONDS; PATON, 2006). Dois cladogramas foram descritos, sendo que *P. amboinicus* está categorizada no Clado 1, como está ilustrada na Figura 6.

Figura 6. Análise filogenética do gênero *Plectranthus*. As linhas contínuas representam grupos que possuem larga utilização popular e as linhas tracejadas indicam grupos de pouca importância.



(Fonte: LUKHOBÁ, SIMMONDS, PATON., 2006)

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng (**Figura 7**) é uma planta aromática de provável origem indiana, perene, pode atingir até 1m de altura, possui folhas com pecíolos

que medem entre 1,5 a 4,5 cm com aspecto carnudo, crenadas e com alto teor mucilaginoso, apresentando sabor e aromas semelhantes ao orégano. Ela é conhecida popularmente no Brasil como malvariço, malvarisco, malva, hortelã da folha grande, hortelã grossa e hortelã grande (MATOS ; *et al.*, 1999).

Figura 7. Classificação botânica de *Plectranthus amboinicus*.



(Fonte própria)

COMPOSIÇÃO QUÍMICA

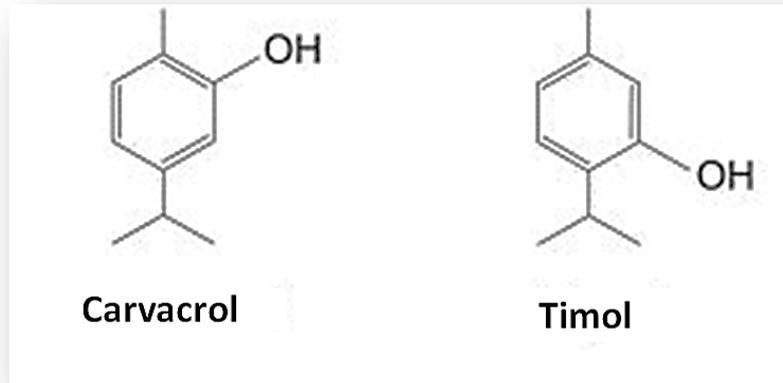
Plectranthus é rico em óleos essenciais e possui como principais constituintes terpenóides (mono e sesquiterpenos). Os terpenóides formam uma larga família com diversas estruturas derivadas das unidades isoprênicas C5. Em sua biossíntese, 3 moléculas de Acetil-CoA formam o ácido mevalônico. O ácido mevalônico sofre descarboxilação e desidratação para formar pirofosfato de isopentila que se condensa com dedimetila para dar origem aos monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e outros terpenos. Os diterpenos são formados pela união de quatro unidades de isopreno e são encontrados principalmente nas resinas de plantas. Eles se apresentam em estruturas acíclicas como o fitol, monocíclicas como a vitamina A, bicíclica, esclareol, tricíclica como ácido abiético que está presente em

grandes quantidades na resina de Coníferas e tetracíclico como a barbatusina (MURTHY; RAMALAKSHMI; SRINIVAS, 2009; LUKHOBBA; SIMMONDS; PATON, 2006).

Dentre as espécies de *Plectranthus* a que apresenta maior rendimento em termos de óleo essencial é a *Plectranthus amboinicus*, que apresenta dois quimiótipos, um rico em timol e outro em carvacrol (MURTHY; RAMALAKSHMI; SRINIVAS, 2009). Na Índia, o óleo essencial de *P. amboinicus* é rico em carvacrol (70%), corroborando com os dados obtidos em um estudo realizado no interior do Ceará que mostrou que o óleo essencial dessa espécie também é rico em carvacrol (68%) (COSTA ; *et al.*, 2010). Em trabalho prévio, nosso grupo mostrou que o óleo essencial da planta pode possuir níveis ainda mais elevados de carvacrol, ou seja de 90,55% (OLIVEIRA ; *et al.*, 2010). Além desses constituintes, outros já foram identificados e isolados, tais como: carvacrol, cariofileno, terpineol, timol, β -cariofileno, óxido de cariofileno, flavonóides como apigenina, quercetina, luteonina e taxifolina, além de ácidos terpênicos e taninos (OLIVEIRA ; *et al.*, 2010).

Carvacrol (2-metil-5-isopropil-fenol) é um dos principais responsáveis pela propriedade antimicrobiana do óleo essencial. A estrutura do timol (5-isopropil-2-metil-fenol) é semelhante a do carvacrol (**Figura 8**) e diferencia-se quanto à localização do grupo hidroxila no anel aromático. Seus mecanismos de ação em bactérias são semelhantes aos de outros compostos fenólicos, ou seja, ambas as substâncias tornam a membrana bacteriana permeável, desintegrando a membrana externa de bactérias Gram-negativas, que liberam lipopolissacarídeos (LPS), e levam ao esgotamento de ATP intracelular e interrupção da força motriz de prótons. A presença de cloreto de magnésio não influencia na ação, sugerindo um mecanismo quelante de diferentes cátions na membrana externa (SILVA ; FERNANDES JÚNIOR, 2010).

Figura 8. Estruturas químicas de Carvacrol e Timol.



(Fonte: BURT, 2004)

USO POPULAR E AÇÃO FARMACOLÓGICA DE *Plectranthus amboinicus*

As propriedades terapêuticas de *Plectranthus* podem ser encontradas nas diversas partes da planta (caules, folhas, raízes e tubérculos). *P. amboinicus* e *P. barbatus* (68% do uso medicinal do gênero) são utilizadas em 13 categorias de doenças referidas no *Economic Botany Data Collection Standard* (COOK, 1995). Como exemplos, podem ser mencionados as doenças respiratórias, de pele, queimaduras, febre, tosse, hemorragias e em infecções bacterianas e virais (RICE ; *et al.*, 2011; LUKHOBA; SIMMONDS; PATON, 2006).

Plectranthus amboinicus é utilizada como anti-séptico bucal com ação protetora na mucosa da boca, balsâmico, no tratamento de rouquidão, inflamação da boca e garganta, constipação, cefaleia, tosse, rouquidão, febre e doenças digestivas (LORENZI ; MATOS, 2002; MORAIS ; *et al.*, 2005). Possui ainda propriedades farmacológicas conhecidas como anticonvulsivante, antiasmática, antiespasmódica, broncodilatador, antimicrobianas, antitumoral e anti-inflamatória. Ela tem sido utilizada principalmente na forma de infusão e de xarope (MATOS, 2000).

Pouco se sabe sobre o efeito antimicrobiano de *P. amboinicus* contra *Klebsiella pneumoniae*. Apenas dois estudos foram encontrados, um realizado por Manjamalai *et al.*, (2010) que avaliou a ação dos extratos em acetona e em metanol e outro realizado por Costa *et al.*, (2010) que avaliou a ação do óleo essencial. No entanto, nenhum outro estudo foi

realizado com o óleo essencial de *P. amboinicus* quanto ao seu efeito antimicrobiano, tampouco sobre seu mecanismo de ação.

Desta forma, baseados na literatura revisada, diante da escassa literatura científica encontrada e da urgente necessidade de respaldar o saber popular sobre a utilidade de *P. amboinicus*, esse estudo busca aprofundar o conhecimento quanto à ação bactericida do mesmo.

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

Baseado em estudos prévios (OLIVEIRA ; *et al.*, 2010) onde pode-se comprovar através de estudos *in vitro* e *in vivo* a ação do óleo essencial e de extratos de *P.amboinicus* contra *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, e pelo fato de que na literatura não há referências sobre a ação do óleo essencial de *P. amboinicus* sobre *Klebsiella pneumoniae*, decidiu-se dedicar o presente trabalho a avaliar sua eficácia sobre cepa padrão e cepas clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae*, bem como investigar alguns de seus mecanismos de ação.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade antibacteriana e mecanismo de ação do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* frente a cepas multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração e identificar a constituição química do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de *P. amboinicus* frente a cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*;
- Avaliar a cinética de crescimento da cepa padrão e cepas clínicas multirresistentes de *K. pneumoniae* na presença do óleo essencial;
- Avaliar a ação do óleo essencial frente a cepa padrão de *K. pneumoniae* contra expressão da cápsula, produção de urease, permeabilidade da parede celular e alteração da membrana celular.

METODOLOGIA

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material botânico

A coleta das folhas de *Plectranthus amboinicus* foi realizada no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará (HPM-FJAM/UFC). Uma exsicata está depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará – UFC sob registro #40080.

Obtenção do óleo essencial

O procedimento para obtenção e análise da constituição química do óleo essencial foi realizado no Departamento de Química orgânica e Inorgânica sob supervisão da Profa. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago.

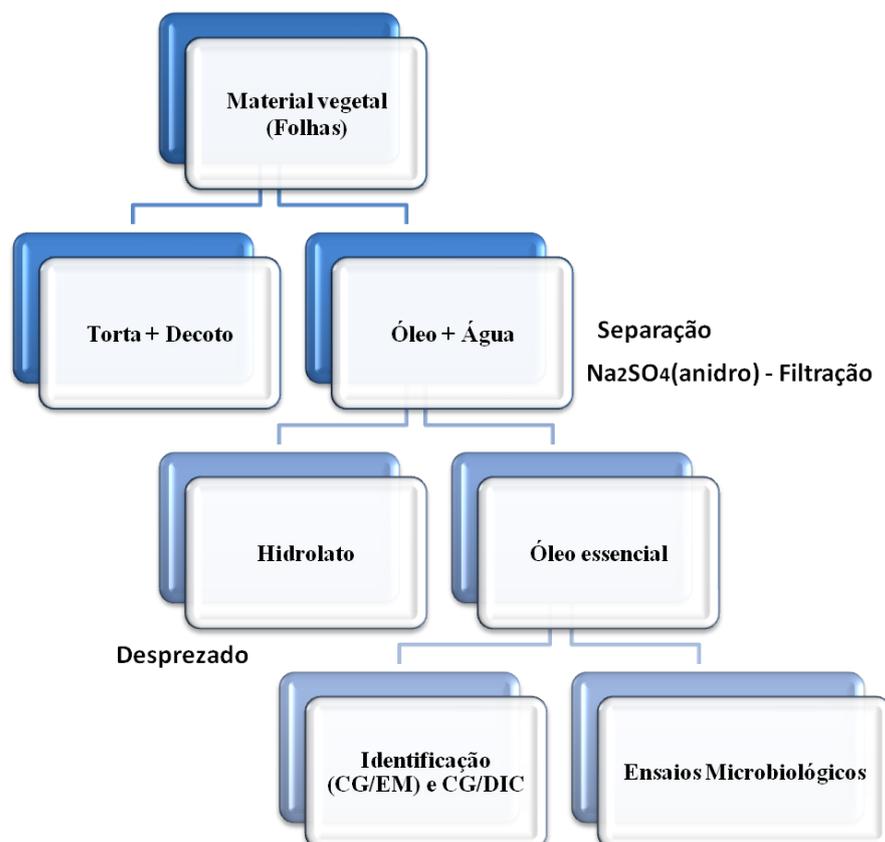
As folhas frescas (2 kg) coletadas no período da manhã foram previamente trituradas e submetidas à extração do óleo essencial através do processo de hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger (**Figura 9**) por duas horas (MATOS ; *et al.*, 1999). O óleo essencial coletado, após secagem com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e filtração, foi pesado obtendo-se rendimento de 0,25%. Em seguida foi armazenado em frascos fechados sob condições de baixa luminosidade a 4°C. O rendimento foi calculado baseado no peso das folhas frescas. O esquema de procedimento de obtenção e processamento do óleo essencial pode ser visualizado na **Figura 10**.

Figura 9. Sistema do tipo Clevenger .



(Fonte própria)

Figura 10. Fluxograma para obtenção e análise do óleo essencial.



(Fonte própria)

ANÁLISE QUANTITATIVA DO ÓLEO ESSENCIAL

A análise quantitativa da composição química do óleo essencial foi realizada com auxílio de um cromatógrafo gasoso acoplado a detector de ionização por chama (CG/DIC), utilizando um equipamento modelo GC-17 A (Shimazu, Japan), sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme) contendo sílica fundida ZB-5MS (dimetilpolisiloxano 5%) e hélio como gás de arraste com fluxo de 1mL/min. A temperatura foi programada mantendo-se 40°C por 1-2 min, seguido de um aumento de 4°C por minuto até atingir 180°C, e novamente seguido de um aumento em intervalos de 20°C até atingir 280°C. Esta temperatura foi mantida por 7 min. A temperatura do injetor foi de 250°C e a do detector (ou interface) foi de 280°C. Injetou-se um volume de 0,5 µL de acetato de etila, com taxa de partição do volume injetado de 1:48 e pressão na coluna de 48,7 kPa. A quantificação dos constituintes se deu pela normatização da área (%).

ANÁLISE QUALITATIVA DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL

A análise qualitativa da composição química do óleo essencial foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM) (Shimadzu, Japan), modelo (QP5050A), equipado com um autoinjeter AOC-20i (Shimadzu, Japan) e provido de uma coluna capilar (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme) contendo sílica fundida (5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano). Foram utilizadas as mesmas condições operacionais da análise quantitativa e espectrômetro de massa com detector de captura iônica com energia de impacto de 70 eV. Os componentes do óleo essencial foram identificados através de correlação com índices de retenção e espectros de massa relatados na literatura (ALENCAR; CRAVEIRO; MATOS, 1984; ADAMS, 2007).

Verificação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios para determinação da CIM do óleo essencial e constituintes isolados (Timol e Carvacrol, Sigma, USA) foram efetuados através do método de microdiluição em caldo Mueller-Hinton, a partir de uma concentração de 1,25% até 0,009% do óleo essencial (CLSI, 2009).

MICROORGANISMOS

Os microrganismos utilizados foram obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC), fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brasil, e de isolados clínicos caracterizados fenotipicamente como multirresistentes obtidos no Hospital Universitário Walter Cantídio – UFC. Todos os testes neste trabalho foram executados em paralelo com uma cepa padrão *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). Após sua caracterização através de provas bioquímicas e teste de sensibilidade a antimicrobianos por disco difusão, as cepas foram mantidas - 20°C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) contendo 20% de glicerol. O perfil de resistência está mostrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Tabela de resistência a drogas em isolados clínicos de *K. pneumoniae*.

Isolados	ATM/										
	Clínicos	AMI	AMP/ASB/CEF	ERT/IPM/MER	COM/CFO/CAZ/PPT	CTX	CEN	CIP	COL	GEN	TIG
K2 (URO)	nt	R	R	R	R	R	nt	S	S	S	S
K5 (SAN)	S	R	R	R	R	R	nt	R	S	S	R
K8 (URO)	nt	R	S	S	R	nt	R	S	nt	R	R
K12 (URO)	I	R	R	R	R	R	nt	R	S	S	S
K16 (ATR)	R	R	R	R	R	R	nt	R	S	R	S

URO: Urocultura; ATR: Aspirado traqueal; SAN: Sangue; nt: não testado; S: Sensível; R: resistente; I: intermediária; AMI: Amicacina; AMP: Ampicilina; ASB: Amp.+Sulbactam; ATM: Aztreonam; CEF: efalotina; CTX: Cefotaxima; CFO: Cefoxitina; CAZ: Ceftazidima; CEN: Ceftriaxona; CIP: Ciprofloxacina; COL: Colistina; ERT: Ertapenem; GEN: Gentamicina; IPM: Imipenem; MER: Meropenem; PPT: Piperacilina+Tazobactam; TIG: Tigeciclina.

PREPARO DOS INÓCULOS

A partir de crescimento e incubação por 24 horas/37°C, foram preparadas suspensões das cepas em caldo BHI (Brain Heart Infusion- Oxoid) as quais foram submetidas a agitação em vortex, obtendo-se uma turvação semelhante ao tubo 0,5 da escala McFarland, que corresponde à concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia – (UFC/mL).

PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL PARA A DETERMINAÇÃO DA CIM

Foi preparada uma solução de óleo essencial de *P. amboinicus* na concentração de 2,5%, em Dimetilsulfóxido 3% (DMSO, VETEC, Brasil). Preparou-se também solução de ciprofloxacina na concentração de 16 µg/mL em água (Sigma Chemical – Louis, Missouri, USA) com objetivo de ser utilizado como controle nos testes.

EXECUÇÃO E LEITURA DOS ENSAIOS

A determinação da CIM do óleo essencial de *P. amboinicus* foi realizada através da técnica de microdiluição (**Figura 11**), utilizando microplacas estéreis com 96 poços (Costar, USA), de fundo plano, com tampa. Foram adicionados aos poços, 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 100 µL da concentração inicial do óleo (em duplicatas), a seguir, foram realizadas diluições seriadas do óleo, a partir da coluna A (primeira coluna), com auxílio de uma pipeta automática multicanal e adicionados 10 µL dos inóculos.

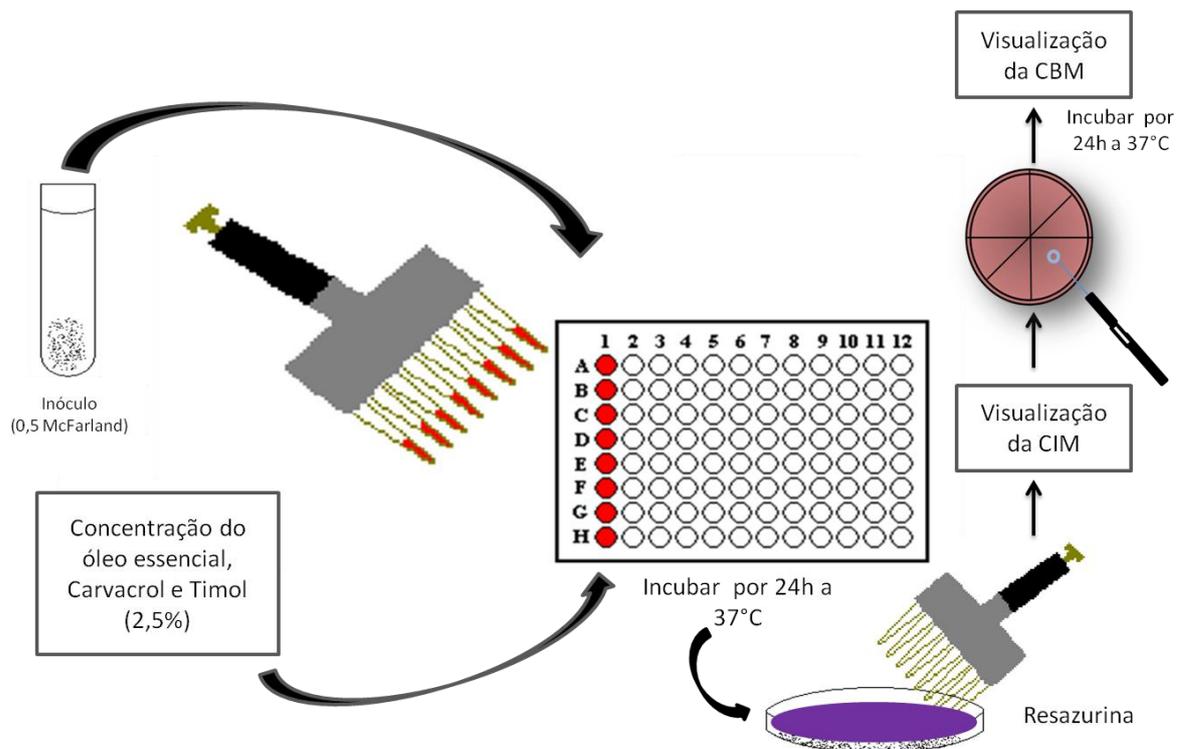
Foram feitos controles de esterilidade (controle do meio e do diluente – DMSO), negativo (Meio + DMSO + inóculo), controle do inóculo (inóculo + Meio) e controle de antibiótico (Meio + inoculo + ciprofloxacina). Em seguida o sistema foi incubado a 37°C durante 24h. Para a leitura do ensaio de microdiluição utilizou-se um método colorimétrico, que consistiu na adição de 10 µL de solução de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido) (Sigma, USA) na concentração de 0,05%. A resazurina é empregada como marcador colorimétrico de reação de óxido-redução (MANN ; MARKHAM, 1998). Após 2h de incubação, foram feitas as leituras visuais. A redução ocorre em dois estágios: o primeiro estágio a resazurina (azul), na presença de células viáveis, é irreversivelmente reduzida à

resofurina de coloração rosada. Em um segundo estágio, a resofurina é reversivelmente reduzida a dihidroresofurina – incolor (MANN ; MARKHAM, 1998; PALOMINO ; *et al.*, 2002).

Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação da CBM, 10 µl de suspensões onde ocorreu a CIM do óleo, 2x e 4x CIM foram retiradas do ensaio anterior e semeadas com auxílio de uma alça em uma placa contendo ágar Mac Conkey e incubadas a 37° C durante 24 h (Figura 11). Após esse período, verificou-se a ocorrência de crescimento bacteriano. A CBM é definida como a menor concentração do óleo essencial que inibe 99% do crescimento bacteriano. Todos os testes foram realizados em triplicata (DEVI ; *et al.*, 2010).

Figura 11. Esquema da determinação da CIM e CBM de *Plectranthus amboinicus* contra *Klebsiella pneumoniae*.



(Fonte própria)

Cinética de inibição do crescimento bacteriano

As taxas de morte foram avaliadas, considerando-se a redução do crescimento bacteriano, quando expostos a uma concentração de 0,16% do óleo essencial (essa concentração representava duas vezes a CIM). Controles positivos (Meio + Inóculo + Antibiótico), controles negativos (Meio + Inóculo) foram preparados e incubados a 37°C. Alíquotas de 10µL foram retiradas nos intervalos de 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 h, diluídas (1:10 a 1:10⁵) e semeadas em placas de ágar Mac Conkey para avaliar o crescimento bacteriano que foi expresso como log de unidades formadoras de colônias por mL (log UFC /mL). Considerou-se atividade bactericida (\geq redução de 3-log em unidade de log₁₀ UFC/mL) e bacteriostática (< redução de 3-log em unidade de log₁₀ UFC /mL) (DEVI ; *et al.*, 2010).

Ensaio do pH

O efeito do pH sobre a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* foi realizado utilizando-se o método ensaio de sensibilidade ao pH, (DEVI ; *et al.*, 2010). Tubos contendo caldo Mueller-Hinton foram ajustados para os pH de 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 usando 0,1 N HCl e NaOH 5M. Foi testada a atividade do óleo essencial frente às cepas padrão e clínicas de *K. pneumoniae*. Ciprofloxacina (16µg/mL) foi utilizada como controle positivo.

Ensaio do Cristal Violeta

A alteração na permeabilidade da membrana foi detectada através do ensaio do cristal violeta, de acordo com o procedimento descrito por Devi et al., 2010. Os inóculos bacterianos foram preparados em caldo BHI de acordo com a escala 0,5 de McFarland. Em seguida, foram centrifugados a 4.500 x g por 5 min a 4° C. A seguir, o sedimento contendo as células foi lavado duas vezes com tampão fosfato salina (PBS) e ressuspensão após a última lavagem com 1 mL de PBS (controle negativo), óleo essencial de *P. amboinicus* (testado na concentração do CIM e duas vezes o CIM), ciprofloxacina (testado na concentração do CIM), e ácido – etilenodiaminotetracético (EDTA) (controle positivo) e incubados por 2 h a 37°C

(todos os testes foram feitos em quintuplicata). Após a incubação, foi realizada centrifugação a 9300 x g por 5 min. Após este procedimento, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS contendo 0,010 mg de cristal violeta. A suspensão celular foi incubada por 10 minutos a 37° C e centrifugados a 13.400 x g por 15 min e a leitura das absorbâncias foram realizadas em comprimento de onda de 590 nm utilizando uma leitora de microplacas universal (Biotek, China).

Efeito de níveis de Sub-CIM e CIM de P. amboinicus na atividade da Urease

A inibição da atividade da urease bacteriana foi determinada pelo procedimento descrito por Derakhshan, Sattari, Bigdeli (2008). Cinco isolados clínicos de *K. pneumoniae* e uma cepa padrão, foram cultivadas durante 18h em caldo uréia contendo concentrações subinibitórias e inibitórias (1/8 a 1 X CIM) do óleo essencial. Células não tratadas com o óleo foram usadas como controle de bactérias. Após incubação, as suspensões foram centrifugadas a 5000 x g por 3 min e foi medida a intensidade de cor em 560 nm, utilizando uma leitora universal de microplacas (Biotek, China). O ensaio foi executado em quintuplicata.

Efeito de níveis de Sub-CIM e CIM de P. amboinicus na expressão da cápsula

Alteração da expressão da cápsula de *K. pneumoniae* por *P. amboinicus* foi avaliado pelo método de coloração de Anthony (DERAKHSHAN; SATTARI; BIGDELI, 2008). Cinco isolados clínicos e uma cepa padrão de *K. pneumoniae* foram cultivadas em caldo de leite (9,5g/L de leite desnatado em pó) por 24 horas na presença de diferentes concentrações do óleo essencial (1/8 a 1x CIM). Após essa etapa, foram realizados esfregaços feitos em lâminas de vidro, deixados secar espontaneamente ao ar. Posteriormente, as lâminas foram recobertas com cristal violeta 1% por 2 min e lavadas delicadamente com uma solução de sulfato de cobre 20%. As células bacterianas não tratadas mostraram-se de coloração arroxeadas com a cápsula transparente e refringente sob microscopia óptica de imersão.

Microscopia de Força Atômica

Alterações na morfologia bacteriana causada pelo óleo essencial de *P. amboinicus* foram analisadas por microscopia de força atômica (MFA). Suspensões de culturas foram incubadas na presença de diferentes concentrações do óleo essencial (1/8 a 1/1xMIC) por 18h a 37°C. As células foram lavadas e centrifugadas a 4.500 x g por 5 min a 4° C, lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em 1 mL na mesma solução. Um volume de 10µL da suspensão foi colocada sobre uma lâmina de vidro e examinado através de um Nanoscópio Microscópio de Força Atômica Multimode III-A (Digital Instruments, Santa Bárbara) usando um cantilever de silício cristalino com uma mola constante nominal 40Nm⁻¹ e frequência de ressonância de 242,38 kHz. Culturas não tratadas foram empregadas como controles (DEVI ; *et al.*, 2010).

Análise estatística

O efeito das diferentes concentrações do óleo essencial de *P. amboinicus* sobre a atividade da urease e na absorção de cristal violeta por *K. pneumoniae* foram analisados por testes de múltipla comparação de análise de variância (ANOVA) e Tukey-Kramer. A significância estatística foi considerada para *p*-valor de 0,05.

ARTIGO



Effect of subinhibitory and inhibitory concentrations of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on *Klebsiella pneumoniae*

Thiaily Braga Gonçalves^{a,b,*}, Milena Aguiar Braga^a, Francisco F.M. de Oliveira^{a,b},
 Gilvandete M.P. Santiago^{c,d}, Cibele B.M. Carvalho^{b,e}, Paula Brito e Cabral^{a,b},
 Thiago de Melo Santiago^f, Jeanlex S. Sousa^f, Eduardo Bedê Barros^f,
 Ronaldo Ferreira do Nascimento^g, Aparecida T. Nagao-Dias^{a,b}

^a Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal Ceará, Rua Capitão Francisco Pedro 1210, CEP 60430-370, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado S/N, CEP 60430-270, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Departamento de Farmácia, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Rua Capitão Francisco Pedro 1210, CEP 60430-370, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Curso de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Cx Postal 12.200, CEP 60021-970, Fortaleza, Ceará, Brazil

^e Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado S/N, CEP 60430-270, Fortaleza, Ceará, Brazil

^f Departamento de Física, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, CEP 60451-970, Fortaleza, Ceará, Brazil

^g Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pict, Bloco 940, Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Antibiotic multiresistance
 Antimicrobial activity
Klebsiella pneumoniae
Plectranthus amboinicus

ABSTRACT

We evaluated the antimicrobial activity and some mechanisms used by subinhibitory and inhibitory concentrations of the essential oil, obtained from leaves of *Plectranthus amboinicus*, against a standard strain of *Klebsiella pneumoniae* and 5 multiresistant clinical isolates of the bacteria. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC), the rate of kill and the pH sensitivity of the essential oil were determined by microdilution tests performed in 96-well plates. Subinhibitory and inhibitory concentrations of the essential oil were tested in order to check its action on *K. pneumoniae* membrane permeability, capsule expression, urease activity and cell morphology. The MIC and MBC of the essential oil were $0.09 \pm 0.01\%$. A complete inhibition of the bacterial growth was observed after 2 h of incubation with twice the MIC of the essential oil. A better MIC was found when neutral or alkaline pH broth was used. Alteration in membrane permeability was found by the increase of crystal violet uptake when the bacteria were incubated with twice the MIC levels of the essential oil. The urease activity could be prevented when all the subinhibitory concentrations were tested in comparison to the untreated group ($p < 0.001$). Alteration of the bacterial morphology besides inhibition of the capsule expression was verified by atomic force microscopy, and Anthony's stain method, respectively. Our data allow us to conclude that the essential oil of *P. amboinicus* can be a good candidate for future research.

© 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Since the introduction of antimicrobial agents, there has been a selective pressure of microorganisms, primarily caused by the indiscriminate use of antibiotics and chemotherapy, which has resulted in the development of resistant species (Peres-Bota et al. 2003; Pittet 2005). One of the most serious public health problems faced in the last decades has been the aggravation of antimicrobial resistance in bacterial populations, especially in nosocomial

outbreaks (Oliveira et al. 2006). An important aspect which frequently results in antibiotic resistance resides on the bacterial enzyme production, such as, beta-lactamases. The beta-lactamases of clinical interest are extended spectrum beta-lactamase (ESBL), carbapenemases (KPC), metallo-beta-lactamase (MBL) and class C beta-lactamase (AmpC). *K. pneumoniae* ESBL is capable of inactivating third generation cephalosporins and monobactams, except carbapenems and are inhibited by beta-lactamase inhibitors such as clavulanate, sulbactam and tazobactam. The enzyme KPC was firstly described in the U.S. in 2001 and was further identified in other countries around the world. This enzyme has the ability to hydrolyze cephalosporins and aztreonam (Patterson and Bonomo 2005; Bertrand et al. 2006).

Many plants are used in Brazil in the form of crude extracts, infusions for treatment of various conditions, including bacterial

* Corresponding author at: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal Ceará, Rua Capitão Francisco Pedro 1210, CEP 60430-370, Fortaleza, Ceará, Brazil. Tel.: +55 85 3366 8270; fax: +55 85 3366 8292. E-mail address: thiaily@gmail.com (T.B. Gonçalves).

and fungal infections (Gurgel et al. 2009). Essential oils have long been used due to their many therapeutic properties, including antiviral, antispasmodic, analgesic, antimicrobial, wound healing, expectorant, soothing, antiseptic airway, larvicide, antihelmintic and antiinflammatory activities (Costa et al. 2010; Oyedeji and Afolayan 2006).

The genus *Plectranthus* involves about 300 species occurring naturally in Africa, Asia and Australia (Lukhoba et al. 2006). Species of this genus exhibit biosynthetic sesquiterpenes, diterpenes and phenolic compounds, some with proven relevant biological properties (Lukhoba et al. 2006).

Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng (Labiatae), also known as *Coleus amboinicus* Lour., *Coleus aromaticus*, *Plectranthus aromaticus* (Benth) (Murthy et al. 2009), and popularly known as “malvarisco”, is an aromatic perennial herb cultivated all over the North and Northeast regions of Brazil (Matos 2000). It is widely used in Brazilian folk medicine for therapeutic purposes against colds, asthma, constipation, headache, cough, fever and digestive diseases (Morais et al. 2005).

This present work proposed to investigate the antimicrobial activity of the essential oil against *K. pneumoniae* standard strains and multiresistant clinical isolates, and also to evaluate the ability of subinhibitory and inhibitory concentrations of *P. amboinicus* essential oil in altering the membrane permeability, the capsule expression and the urease activity of *K. pneumoniae*, its rate of kill and its capability on growing in different pH conditions.

Materials and methods

Plant material

Leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng were collected from the Horto de Plantas Mediciniais Professor Francisco José de Abreu Matos (Fortaleza, Ceará, Brazil). A voucher specimen (EAC40080) has been deposited at the Herbário Prisco Bezerra (EAC), Universidade Federal do Ceará, Brazil.

Extraction of the essential oil

The fresh leaves of *P. amboinicus* were subjected to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus for 2 h to afford pale yellow oil. The isolated oil, after drying over anhydrous sodium sulfate and filtration, was stored in sealed glass vials and maintained under refrigeration until further analysis. The yield (w/w) was calculated based on the fresh weight of the leaves.

The essential oil was obtained in three different periods and analyzed by gas chromatography (GC) and GC/MS in order to compare the chemical constituents from each extraction. The essential oils were named S1, S2 and S3.

Chemical analysis of the essential oil

Gas chromatography (GC) analysis was performed on a Shimadzu GC-17A gas chromatograph equipped with a flame

ionization detector using a non-polar DB-5 fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness). Hydrogen was used as carrier gas at a flow rate of 1 ml/min and 30 psi inlet pressure; split ratio 1:30. The column temperature was programmed from 35 °C to 180 °C at a rate of 4 °C/min, then heated at a rate of 17 °C/min to 280 °C and held isothermal for 10 min; both injector and detector temperatures were 250 °C.

The GC/MS analysis was carried out on a Hewlett-Packard Model 5971 GC/MS instrument, using a non-polar DB-5 fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.1 μm film thickness); carrier gas helium, flow rate 1 ml/min and with split mode. The injector and detector temperatures were 250 °C and 200 °C, respectively. The column temperature was programmed from 35 °C to 180 °C at 4 °C/min and then 180 to 250 °C at 10 °C/min. Mass spectra were recorded from 30 to 450 m/z.

Individual components were identified by matching their 70 eV mass spectra with those of the spectrometer database using the Wiley L-built library and two other computer libraries. Mass spectrometry (MS) searches using retention indices as a pre-selection routine, as well as by visual comparison of the fragmentation patterns with those reported in the literature (Alencar et al. 1990; Adams 2007).

Microbial strains

The *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) was obtained from the Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. Five clinical isolates were obtained from the Hospital Universitário Walter Cantídio (Fortaleza, Ceará, Brazil). The clinical isolates were analyzed by standard methods for identification of *Enterobacteriaceae* (Koneman 2008). Susceptibility profile was tested by disc-diffusion agar (CLSI 2009) with the following drugs: amikacin, ampicillin, ampicillin + sulbactam, cephalothin, cefoxitin, cefpime, caeftazidime, ceftriaxone, gentamicin, imipenem, meropenem, piperacillin, quinolones, and sulfazotrim ticarcillin + clavulanic acid (Table 1).

Determination of the minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration

To determine the minimal inhibitory concentration we performed microdilution tests (CLSI 2009) in 96-well microplates (Costar, USA). Each well contained 100 μl Mueller-Hinton Infusion (MHI) broth, 10 μl of inoculum (1.5×10^8 CFU/ml) and 100 μl of the essential oil, which ranged from 0.009% to 1.25% (v/v) in DMSO 3%. The inoculum bacterial concentration was determined by adjusting its turbidity (at 625 nm) to 0.5 McFarland scale. The plates were covered and incubated for 24 h at 37 °C. The lowest concentration of the test sample in which no growth could be visualized was defined as the MIC. We used ciprofloxacin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), ranging from 0.125 to 32 μg/ml, as the positive control and dimethyl sulfoxide (Merck, Darmstadt, Germany), ranging from 0.039 to 10% (v/v), as the negative control. After the incubation

Table 1

Table of pattern of drug resistance in *K. pneumoniae* clinical isolates: CE, clinical specimen; URO, uroculture; ATR, tracheal aspirate; BLO, blood; NT, not tested; S, sensitive; R, resistant; I, intermediate; AMI, amikacin; AMP, ampicillin; ASB, ampicillin + sulbactam; ATM, aztreonam; CEP, cephalothin; FM, cefepime; CTX, cefotaxime; CFO, cefoxitin; CAZ, ceftazidime; CEN, ceftriaxone; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; ERT, ertapenem; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; MER, meropenem; PPT, piperacillin + tazobactam; TIG, tigecycline.

Clinical isolates	AMI	AMP/ASB/CEF	ATM/ERT/IPM/MER	COM/CFO/CAZ/PPT	CTX	CEN	CIPRO	COL	GEN	TIG
K2 (uro)	nt	R	R	R	R	nt	S	S	S	S
K5 (blood)	S	R	R	R	R	nt	R	S	S	R
K8 (uro)	nt	R	S	R	nt	R	S	nt	R	R
K12 (uro)	I	R	R	R	R	nt	R	S	S	S
K16 (atr)	R	R	R	R	R	nt	R	S	R	S

period, 10 µl of sterile 0.05% resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide) (Sigma, USA) in aqueous solution were added to the plates. After 2 h of incubation, the readings were done. A color change caused by the reduction of resazurin to resorufin indicated presence (pink color) or absence (blue color) of cell viability (Palomino et al. 2002). The minimal bactericidal concentration was determined for the essential oil by subculturing 5 µl from each tube (MIC, 2 and 4 × MIC) onto BHI agar. The MBC was defined as the lowest concentration of the essential oil that could inhibit 99% of the bacterial growth. The tests were run in triplicate with the three samples (S1–S3) of the essential oil.

pH sensitivity assay

The effect of pH on antibacterial activity of *P. amboinicus* essential oil (S1) and ciprofloxacin against *K. pneumoniae* was done according to the procedure described by Devi et al. (2010). Cultures of the standard strain were grown on Muller-Hinton broth previously prepared and calibrated to different pH ranges (from 5.5 to 9.0). The MIC was determined.

Determination of rate of kill

One milliliter of the standard strain was adjusted to the concentration of 1.5×10^8 CFU/ml and incubated at 35 °C for 2 h, before its addition to tubes containing 0.16% (which represented two times the MIC). Control tubes were also prepared without the essential oil (S1). The tubes Test and Control were incubated at 37 °C and aliquots of 10 µl were collected at intervals of 0, 2, 4, 6, 8 and 24 h after the addition of the plant samples. Serial dilutions were plated onto MacConkey agar to determine the number of viable cells which was expressed as log of colony forming units per ml (log CFU/mL). The bactericidal (≥ 3 -log-unit reduction in log₁₀ CFU/ml) and bacteriostatic activities (< 3 -log-unit reduction in log₁₀ CFU/ml) were determined (Devi et al. 2010).

Crystal violet assay

The alteration in membrane permeability was detected by crystal violet assay according to the procedure described in literature (Devi et al. 2010). Briefly, suspensions of the bacteria were prepared in Brain Heart Infusion (BHI) broth. Cells were harvested at 4500 × g for 5 min at 4 °C. The cells were washed twice and resuspended in PBS at pH 7.4. The essential oil (S1) of *P. amboinicus* (tested at MIC and twice the MIC), the antibiotics (tested at MIC), besides ethylenediamine tetraacetic acid or EDTA (positive control) and phosphate buffered saline or PBS (negative control) were added to the cell suspensions and incubated for 30 min at 37 °C (all tests were done in quintuplicate). The cells were harvested at 9300 × g for 5 min. After this procedure, the cells were resuspended in PBS containing 0.010 mg of crystal violet. The cell suspension was then incubated for 10 min at 37 °C and centrifuged at 13400 × g for 2 h and the OD₅₉₀ of the supernatant was measured.

Effect of sub-MIC and MIC levels of *P. amboinicus* essential oil on urease activity

Bacterial urease activity was determined by the procedure described by Derakhshan et al. (2008). Five clinical isolates of *K. pneumoniae* and the ATCC standard were grown overnight in urea broth containing sub-MIC and MIC levels of the essential oil (S1) (1/8 to 1/1 × MIC). Untreated cells were used as negative control. All tubes were incubated for 24 h at 37 °C. Next, the suspensions were centrifuged at 5000 × g for 3 min and the supernatants were recovered. Color intensity was measured at 560 nm using a universal

microplate reader (Biotek, China). The samples were run in triplicate.

Effect of sub-MIC and MIC levels of *P. amboinicus* essential oil on bacterial capsule expression

The *K. pneumoniae* capsule was stained by the Anthony's capsule stain, which procedure was described in literature (Derakhshan et al. 2008). Briefly, five clinical isolates of the bacteria and the ATCC standard strain were grown in milk broth (9.5 g powder milk/l) for 24 h in the presence of different concentrations of the essential oil (S1) (1/8 to 1/1 × MIC). Smears were prepared on glass slides and allowed to air dry. Thereafter, the slides were covered with 1% crystal violet for 2 min and rinsed gently with a 20% copper sulfate solution. The bacterial cells (not treated control) would appear purplish while the capsules would appear transparent under an oil immersion lens at optical microscopy.

Atomic force microscopy

Changes in the morphology of *K. pneumoniae* caused by the essential oil of *P. amboinicus* were analyzed by atomic force microscopy (AFM) (Braga and Ricci 1998). Suspensions of cultures were incubated in the presence of different concentrations of the essential oil (S1) (1/8 to 1/1 × MIC) for 18 h at 37 °C. The cells were washed and centrifuged at 4500 × g for 5 min at 4 °C, washed twice and resuspended in PBS. A volume of 10 µl of the suspension was placed on a glass slide and dried in air for 15 min. Then the sample was examined by a Multimode Atomic Force Microscope Nanoscope III-a (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). Scans were performed in air and amplitude images were acquired by intermittent contact mode using crystalline silicon cantilevers (Veeco-probes) with a spring constant of approximately 40 N/m, resonance frequency of 242.38 kHz and tip radius of 15 nm. The amplitude images can be used to better evidence cell borders and their shape. Cultures of not treated *K. pneumoniae* were taken as controls.

Statistical analysis

The effect of various concentrations of *P. amboinicus* essential oil on the *K. pneumoniae* urease activity and on the uptake of crystal violet by the bacteria were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey–Kramer multiple comparisons tests. The statistical significance was considered at *p*-value of 0.05.

Results

Chemical analysis of the essential oil and determination of the minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration

Three different samples of essential oil from the leaves of *P. amboinicus* were analyzed by GC and CG/MS. Table 2 shows the chemical composition of the three samples of the essential oil. Carvacrol (90–98%) is the major constituent identified in all samples. The samples of essential oil obtained in different periods have few differences in their chemical constitutions.

All tested strains (clinical and the standard) were susceptible to the essential oil (MIC mean ± standard error, that is, 0.09 ± 0.01%, *n* = 6). The MIC and MBC were the same. The tests were repeated with the other essential oil samples and the results were similar. For this reason, the following experiments were done with just one of the samples, that is, S1.

Table 2
Chemical composition of essential oil from leaves of *P. amboinicus*.

Compound	RI	RT	S1	S2	S3
4-Terpineol	1177	16.80	1.34	–	–
Carvacrol	1298	21.39	90.55	95.39	98.03
β-Caryophyllene	1417	25.46	3.09	–	0.01
α-Bergamotene	1433	25.97	1.78	–	–
Caryophyllene oxide	1583	30.97	1.36	–	0.20
p-Cimene	1024	8.28	–	–	1.65
γ-Terpinene	1059	9.55	–	–	0.01
α-trans-Bergamotene	1434	25.79	–	–	0.02
α-Caryophyllene	1454	25.49	–	–	0.02
Total identified	–	–	98.12	95.39	99.94

RI: relative retention index; RT: retention time; S: sample of essential oil of *P. amboinicus*.

Table 3
Effect of pH on antibacterial activity of *P. amboinicus* essential oil against *Klebsiella pneumoniae*.

pH	Essential oil		Cipro (μg/ml)
	%	μg/ml	
5.5	0.08	700.00	4.0
6.0	0.08	700.00	4.0
6.5	0.08	700.00	4.0
7.0	0.08	700.00	2.0
7.5	0.04	350.00	2.0
8.0	0.04	350.00	1.0
8.5	0.04	350.00	1.0
9.0	0.04	350.00	1.0

Determination of rate kill

Treatment of *K. pneumoniae* with 0.16% of essential oil, which represented two times the MIC, of essential oil was enough to kill all the bacteria after 2 h of incubation compared to control and to ciprofloxacin.

pH sensitivity assay

With respect to the pH sensitivity assay, a better MIC was found when neutral or alkaline pH broth was used (Table 3). Similar results were found when ciprofloxacin was tested.

Crystal violet assay

The uptake of crystal violet was considered to be significant when twice the MIC of essential oil was used (Table 4), compared to the not treated group ($p < 0.01$) or to ciprofloxacin ($p < 0.01$) and to EDTA ($p < 0.05$). EDTA is a chelating agent which increases the membrane permeability of the bacterial cells.

Effect of sub-MIC and MIC levels of *P. amboinicus* essential oil on urease activity

All the concentrations of the essential oil tested could significantly reduce the urease activity, compared to the not treated group ($p < 0.001$), as shown in Fig. 1. The dashed line in Fig. 1 is the best exponential fit of the data.

Effect of sub-MIC levels of *P. amboinicus* essential oil on bacterial capsule

As shown in Fig. 2, smaller colonies with reduced expression of capsules could be found when the bacteria were treated with $1/8 \times \text{MIC}$ of the essential oil compared to the not treated controls (Fig. 2a and b). However, when the bacteria were treated with $1/4$

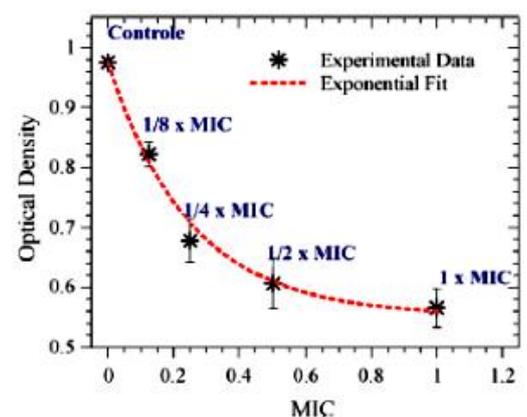


Fig. 1. Effects of sub-inhibitory ($1/8$ to $1/2$) and inhibitory concentrations of *P. amboinicus* essential oil on *Klebsiella pneumoniae* urease activity. It shows the absorbance averaged over five samples vs the MIC. The dashed line is the best exponential decay fitting of the experimental data (optical density = $0.552 + 0.423 \exp(-\text{MIC}/0.251)$). This expression indicates that for sufficient high values of MIC the absorbance presents a saturation value, near 0.552.

or higher subinhibitory concentrations of the essential oil almost no bacteria could be found, only cellular debris (Fig. 2c–e).

Atomic force microscopy

According to the atomic force microscopy (Fig. 3A and B), the morphology of untreated *K. pneumoniae* was smooth and regular with an intact cell membrane and individual bacteria were readily distinguishable. Fig. 3A shows after 24 h of treatment with $1/8$ and $1/4 \times \text{MIC}$ essential oil (Fig. 3Ab and Ac), it was observed an increasing loss of the membrane integrity with a consequent altered morphology of the bacteria. Finally, a severe cell damage was verified when $1/2 \times \text{MIC}$ and the inhibitory concentrations ($1 \times \text{MIC}$ and $2 \times \text{MIC}$) were used (Fig. 3Ad, Ae and Af). Fig. 3B shows the three dimensional aspect of the not treated bacteria compared to those treated with twice the MIC of the *P. amboinicus* essential oil.

Discussion

It is known that the composition of the essential oils varies according to the geographical region, age of the plant, methods of extraction (Murthy et al. 2009). For instance, comparing the literature data, carvacrol comprised 70% (Castillo and González 1999), 58–65% (Dorman and Deans 2000), 50% (Pino et al. 1990), and, 28.65% (Senthilkumar and Vankatesalu, 2010), of the *P. amboinicus* essential oil, meanwhile our extraction contained 90–98% of carvacrol. Others found 94.3% of thymol as the major constituent of the essential oil (Singh et al. 2002).

Table 4

Crystal violet uptake by *Klebsiella pneumoniae* previously incubated with *Plectranthus amboinicus* essential oil. The results were expressed by mean of OD₅₉₀ values ± standard error. The samples were tested in quintuplicate.

Groups	PBS	EDTA	CIPRO	Essential oil	
				MIC	2 × MIC
X _{abs} ± EM	0.412–0.013	0.383–0.019	0.412–0.037	0.315–0.029	0.254–0.016
Cl ₉₅	0.371–0.454	0.329–0.437	0.308–0.517	0.234–0.396	0.209–0.299
p	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	<0.01 (vs PBS and CIPRO) <0.05 (vs EDTA)

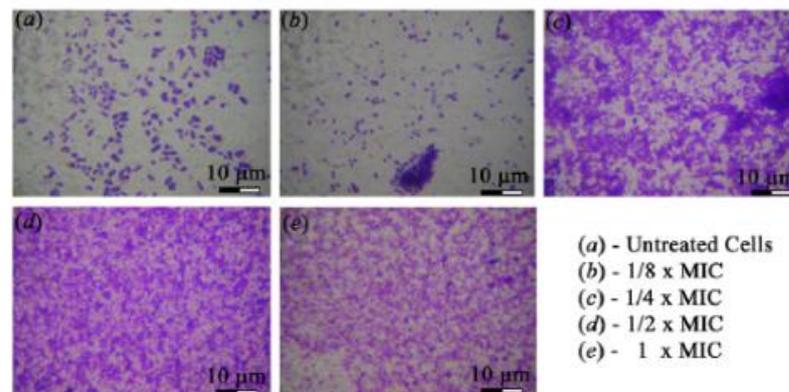


Fig. 2. Effects of sub-inhibitory (1/8 to 1/2), inhibitory and twice the inhibitory concentrations of *P. amboinicus* essential oil on *Klebsiella pneumoniae* capsule expression. The bacteria were stained with the Anthony capsular staining method. The colony morphology and capsule visualization was done under light microscopy (magnification 1000× with 3× optical zoom).

Carvacrol is a monoterpene phenol which is known to be either bactericidal or bacteriostatic agent, depending on the concentration used (Nostro et al. 2004). Previous studies reported that carvacrol had the property of destroying the cellular membrane of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* (Dorman and Deans 2000).

P. amboinicus essential oil presents bactericidal effect when a concentration of twice the MIC is added to *K. pneumoniae* suspension. After 2 h of incubation, there is a complete loss of bacterial viability. The data shown is relevant by the fact *K. pneumoniae* is one of the main pathogens associated with nosocomial infections; also, as the pH sensitivity test showed, the essential oil was

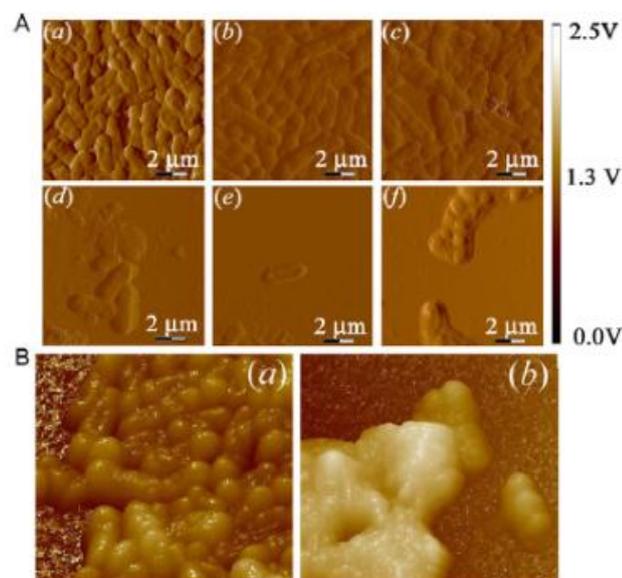


Fig. 3. (A) AFM images of *Klebsiella pneumoniae* exposed to 1/8 × MIC to 2 × MIC of *P. amboinicus* essential oil. Amplitude images show the morphology of cells. Control (a), treated cells with 1/8 × MIC (b), 1/4 × MIC (c), 1/2 × MIC (d), 1 × MIC (e) and 2 × MIC (f). The scale bar in volts corresponds to changes in the oscillation's amplitude of the free cantilever. (B) AFM images of *Klebsiella pneumoniae*. Three-dimensional aspect of the untreated bacteria (a) compared to those treated with twice the MIC of the *P. amboinicus* essential oil (b).

more active in higher pH ranges. These data are valuable, once *K. pneumoniae* can grow in the small intestine, where pancreatic juice and bile make the environment pH highly alkaline (Koneman 2008).

Klebsiella pneumoniae is a nonmotile enteric organism that ferments lactose, decarboxylates lysine, hydrolyzes urea, and forms large mucoid colonies, due to the presence of capsule (Koneman 2008). The capsule of *K. pneumoniae* consists of thick and dense bundles of fine fibers, which contributes to its high virulence capacity.

Generally, subinhibitory concentrations of an essential oil, although not able to kill bacteria, can modify the architecture of their outermost surface and may interfere with some bacterial functions (Derakhshan et al. 2008). In our study, when *K. pneumoniae* was tested in the presence of 1/8 MIC of *P. amboinicus* essential oil, an alteration of its morphology besides reduction of capsule expression was found. When higher subinhibitory concentrations (1/4 and 1/2) of the essential oil were tested, almost no bacteria could be visualized, but only cellular debris. This could mean that subinhibitory concentration of 1/8 × MIC could reduce the bacterial capacity of capsule expression. Besides this observation, alteration in membrane permeability was detected by the increase of crystal violet uptake when the bacteria were incubated with twice the MIC levels of *P. amboinicus* essential oil. Loss of membrane integrity and leakage of intracellular components could be demonstrated by the atomic force microscopy, when 1/2 × MIC levels of the essential oil was used, and a complete destruction of the cells at the inhibitory concentrations (MIC and 2 × MIC) of the plant sample.

Many microorganisms need to use urease in order to obtain nitrogen for their growth (Maroncle et al. 2006). Urease catalyzes the hydrolysis of urea to ammonia and carbamate and has been found to be implicated in kidney and bladder stone formation and to the pathogenesis of several diseases. Urease inhibitors are potential alternatives for the prevention of *K. pneumoniae* from colonizing the gastrointestinal tract, where is plenty of urea (Koneman 2008; Hostacká 2000; Maroncle et al. 2006). Imipenem and ofloxacin, do not affect the enzyme activity (Hostacká 2000). Our data showed a strong inhibition of urease activity by the *P. amboinicus* essential oil in all concentrations tested compared to the not treated bacteria ($p < 0.001$). Although 1/8 MIC was only able to reduce 15.7% of the urease activity, 1/4 × MIC to 1 MIC reduce from 30.5% to 42%, respectively. These percentages of the enzyme inhibition were superior to β-lactam and aminoglycoside actions (20% of inhibition), and equivalent or superior to acetohydroxamic acid (30% of inhibition), which is frequently used to inhibit urease activity (Maroncle et al. 2006; Rauf et al. 2011). On the other hand, it has been recently shown novel barbituric and thiobarbituric acid-derived sulfonamides with ability to inhibit more than 88% of the urease activity when the drugs were tested at 500 μM concentrations (Rauf et al. 2011).

Conclusion

The results of our data clearly demonstrated that essential oil of *Plectranthus amboinicus* possesses a potential antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae*. Subinhibitory concentrations of the essential oil could affect the capsule expression, alterations in membrane integrity, inhibition of the urease activity. At bactericidal concentrations, a complete destruction of the bacteria was found. Our data allow us to conclude that the essential oil of *P. amboinicus* could be a good candidate for future research.

Conflict of interest

No conflict to disclose.

Acknowledgements

This research was financially supported by the CNPq (Processes 579437/2008-6 and 554970/2010-4) and FUNCAP/PPSUS (Process 09100057-2).

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Alencar, J.W., Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Machado, M.L., 1990. Kovats indices simulation in essential oils analysis. *Quimica Nova* 13, 282–284.
- Bertrand, S., Weill, F.-X., Cloeckart, A., Vrints, M., Mairiaux, E., Praud, K., Dierick, K., Wildemaue, C., Godard, C., Butaye, P., Imberechts, H., Grimont, P.A.D., Collard, J.-M., 2006. Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology* 44, 2897–2903.
- Braga, P.C., Ricci, D., 1998. Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 42, 18–22.
- Castillo, R.A.M., González, V.P., 1999. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 4, 110–115.
- CLSI, 2009. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 18th Informational Supplement. CLSI M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, pp. 15–18.
- Costa, J.G., Campos, A.R., Brito, S.A., Pereira, C.K.B., Souza, E.O., Rodrigues, F.F.G., 2010. Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. *Pharmacognosy Magazine* 6 (24), 331–334.
- Derakhshan, S., Sattari, M., Bigdeli, M., 2008. Effect of subinhibitory concentrations of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32, 432–436.
- Devi, K.P., Nisha, S.A., Sakthivel, R., Pandain, S.K., 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology* 130, 107–115.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308–316.
- Gurgel, A., Silva, J.G., Grangeiro, A.R.S., Xavier, H.S., Oliveira, R.A.G., Pereira, M.S.V., Souza, I.A., 2009. Antibacterial effects of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Latin American Journal of Pharmacy* 28 (3), 460–464.
- Hostacká, A., 2000. The *in vitro* effect of imipenem and ofloxacin on enzymic activity of *Klebsiella* strains. *Folia Microbiologica* 45, 387–390.
- Koneman, E.W., 2008. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 209–290.
- Lukhoba, C.W., Simmonds, M.S.J., Paton, A.J., 2006. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 1–24.
- Maroncle, N., Rich, C., Forestier, C., 2006. The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress. *Revista de Microbiologia* 157, 184–193.
- Matos, F.J.A., 2000. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*, vol. 2, pp. 36–42.
- Morais, S.M., Dantas, J.D.P., Silva, A.R.A., Magalhães, E.F., 2005. *Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará*. *Revista Brasileira de Farmacognosy* 15, 169–177.
- Murthy, P.S., Ramalakshmi, K., Srinivas, P., 2009. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chemotherapy* 114, 1014–1018.
- Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, L., Roccaro, S., Alonzo, V., 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters* 230, 191–195.
- Oliveira, J.F.P., Cipullo, J.P., Burdman, E.A., 2006. Nefrototoxicidade dos aminoglicosídeos. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 21 (4), 444–452.
- Oyedede, A.O., Afolayan, A.J., 2006. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil isolated from South African *Mentha longifolia* (L.) L. subsp. *capensis* (Thunb.) Briq. *The Journal of Essential Oil Research* 18, 57–59.
- Palomino, J.C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swing, J., Portaels, F., 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (8), 2720–2722.
- Patterson, D.L., Bonomo, R.A., 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology* 18, 657–686.
- Peres-Bota, D., Rodriguez, H., Dimopoulos, G., 2003. Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients? *Journal of Infection* 47, 307–316.
- Pino, J., Rosado, A., Borges, P., 1990. Volatile components in the essential oil of wild oregano (*Coleus amboinicus* Lour.). *Food Nahrung* 34, 819–823.

- Pittet, D., 2005. Infection control and quality health care in the new millennium. *American Journal of Infection Control* 33, 258–267.
- Rauf, A., Ahmed, F., Qureshi, A.M., Aziz-ur-Rehman, Khan, A., Qadir, M.I., Choudhary, M.I., Chohan, Z.H., Youssoufid, Z.M.H., Haddad, T.B., 2011. Synthesis and urease inhibition studies of barbituric and thiobarbituric acid derived sulphonamides. *Journal of the Chinese Chemical Society* 58, 528–533.
- Singh, G., Singh, O.P., Prasad, Y.R., Lamposona, M.P., Catalan, C., 2002. Studies on essential oils. Part 33. Chemical and insecticidal investigations on leaf oil of *Coleus ambotnicus* Lour. *Flavour and Fragrance Journal* 17, 440–442.
- Senthikumar, A., Vankatesalu, V., 2010. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus ambotnicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. *Parasitology Research* 107, 1275–1278.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* possui ação contra *Klebsiella pneumoniae*. Concentrações sub-inibitórias do óleo essencial podem afetar a expressão de fatores de virulência de *K. pneumoniae* como cápsula e urease e sobre a integridade da membrana. Em concentrações bactericidas, uma destruição completa da bactéria foi encontrada. Desta forma, mostra-se como uma alternativa para terapia antimicrobiana contra bactérias multirresistentes, no caso, *K. pneumoniae* (demonstrado no presente trabalho) e *S. aureus* oxacilina-resistentes (estudo prévio do grupo). Podendo atribuir sua ação ao constituinte majoritário, carvacrol.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBEG, P. T. G. M.; SILVA, L. L. Controle de infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 47-58, 2011.
- ADAMS, R. P. **Indetification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry**. Illinois: Allured Publishing, 2007.
- ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Kovats indexes as a preselection routine in mass-spectra oils analysis. **Journal natural products**, v. 47, p. 890-892, 1984.
- ANDRADE, S. S. ; *et al.* Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacilli isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program. **The Brazilian journal infectious diseases**, v. 12, p. 3-9, 2008.
- APARNA, M.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and disease. **The Brazilian Journal of Infectious diseases**, v. 12, n. 6, p. 526-530, 2008.
- APECIH. Infecções hospitalares no Brasil: uma medida de sua magnitude nos anos 1990 e comparação com os índices europeus. **ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR**, 2005. Disponível em: <www.apecih.org.br/infecoes_hospitalares.htm>. Acesso em: 11 out. 2011.
- ARIFIN, H. ; *et al.* Antibiotic resistance patterns in nosocomial Gram-negative bacterial infections in units with heavy antibiotic usage. **Journal Tropical Pediatric**, v. 50, n. 1, p. 26-32, 2004.
- BEHAR, P. R. P. **Influência da seleção do grupo controle na análise de fatores de risco para infecções hospitalares por Klebsiella pneumoniae produtora de B-lactamase de espectro estendido**. [S.l.]: [s.n.], 2004. 91 p.
- BERTRAND, S. ; *et al.* Clonal emergence of extended-spectrum betalactamase (CTX-M-2) producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (200 to 2003). **Journal Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2897-2903, 2006.
- BILAL, N. E.; GEDEBOU, M. Clinical and community strains of *Klebsiella pneumoniae*: multiple and increasing rates of antibiotic resistance in Abha, Saudi Arabia. **British Journal of Biomedical Science**, v. 57, p. 185-191, 2000.
- BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology**, v. 14, p. 933-951, 2001.
- BRATU, S. ; *et al.* Rapid spread of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, p. 1430-1435, 2005.
- BRENNER, D. J.; STEIGERWALT, A. G.; FANNING, G. R. Differentiation of *Enterobacter aerogenes* from *Klebsiella* by desoxyribonucleic acid reassociation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 22, p. 193-200, 1972.

- BUCHALLA, C. M.; WALDMAN, E. A.; LAURENTI. A mortalidade por doenças infecciosas no início e no final do século XX no município de São Paulo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 4, p. 335-344, 2003.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- CHHIBER, S.; AGGARWAL, S.; YADAV, V. Contribution of capsular and lipopolysaccharide antigens to the pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* respiratory tract infection. **Folia Microbiology**, v. 48, p. 699-702, 2003.
- CLSI, C. A. L. S. I.-. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. CLSI M07-A8**. [S.l.]: [s.n.], 2009. 15-18 p.
- COOK, F. E. M. **Economic Botany Data Collection Standard. International Working Group on Taxonomic Databases for Plant Sciences (TDWG)**. UK: Royal Botanic Gardens Kew, 1995. 146 p.
- COSGROVE, S. E. The Relationship between Antimicrobial Resistance and Patient Outcomes: Mortality, Length of Hospital Stay and Health Care Costs. **Clinical Infection Diseases**, v. 42, p. 82-89, 2006.
- COSTA, J. G. M. ; *et al.* Chemical composition, Antibacterial and Fungicidal Activities of Leaf Oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **The Journal Of Essential Oil Research**, v. 22, p. 183-185, 2010.
- DERAKHSHAN, S. B. S.; SATTARI, M.; BIGDELI, M. Effect of subinhibitory concentrations of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 432-436, 2008.
- DEVI, K. P. ; *et al.* Eugenol (an essential oil of clove) acts as antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107-115, 2010.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied Microbiology**, v. 88, n. 22, p. 308-316, 2000.
- DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARTA, A. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 925-932, 2001.
- GONÇALVES, T. B. ; *et al.* **Atividade do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* contra *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa***. Florianópolis, SC.: [s.n.]. 2010.
- GOODMAN; GILMAN. **As Bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. 1647 p.
- GUIDELINE, S. J. D. ; *et al.* Infection control practices advisory committee management of multidrug resistant organism in healthcare settings. **Healthcare-CDC**, 2006.
- GUPTA, A. ; *et al.* Extended Spectrum β Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature. **Journal of Perinatology**, v. 23, p. 439-443, 2003.

HARLEY, R. M.; REYNOLDS, T. **Advances in Labiatae Science**. Great Britain: Royal Botanic Gardens Kew, 1992.

HIRSCH, E.; TAM, V. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1119-1125, 2010.

ISO - International Organization for Standardization. Aromatic Natural raw materials. **ISO 9235**, Geneva, 1997.

JAWETZ, E. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2009. 820 p.

KANG, C. I. ; *et al.* Bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. **Antimicrobial Agents**, v. 48, p. 4574-4581, 2004.

KONEMAN. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565 p.

LAMBERT, R. J. W. ; *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.

LAVENDER, H. F.; JAGNOW, J. R.; CLEGG, S. Biofilm formation in vitro and virulence in vivo of mutants of *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 4888-4890, 2004.

LEAVITT, A. ; *et al.* Ertapenem resistance among extended-spectrum β lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. **The Journal of Microbiology**, v. 47, p. 969-974, 2009.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature medicine supplement**, v. 10, n. 12, p. 122-129, 2004.

LOPEZ-PUEYO, M. K. E. A. Multirresistencia antibiótica em unidades de críticos. **Medicina intensiva**, Barcelona, v. 35, n. 1, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. [S.l.]: Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002.

LUKHOBA, C. W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 11, p. 1-24, 2006.

MANJAMALAI, A. ; *et al.* Analysis of phytochemical constituents and anti-microbial activity of some medicinal plants in Tamilnadu, India.. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 120-128, 2010.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538-544, 1998.

MARCHAIM, D.; NAVON-VENZIA, S.; SCHWABER, M. J. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species; emergence of KPC-carbapenemase, molecular characterization, epidemiology and outcomes. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 52, p. 184-193, 2008.

- MARONCLE, N.; RICH, C.; FORESTIER, C. The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress. **Research in Microbiology**, p. 184-193, 2006.
- MATOS, F. J. A. ; *et al.* Essential oil of *Mentha x villosa* Huds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 41-44, 1999.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000.
- MAY, A. ; *et al.* Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. **Horticultura Brasileira.**, v. 26, p. 379-382, 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Portaria n° 971 de 3 de maio de 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 4 maio 2006.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.
- MORAIS, S. M. ; *et al.* Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 169-177, 2005.
- MURTHY, P. S.; RAMALAKSHMI, K.; SRINIVAS, P. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. **Food Chemistry**, v. 14, p. 1014-1-18, 2009.
- NEVES, P. R. ; *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.
- NOGUEIRA, P. S. F. ; *et al.* Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Revista Enfermagem UERJ**, v. 17, n. 1, p. 96-101, 2009.
- OLIVEIRA, F. F. M. ; *et al.* **Efeito aditivo do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* frente *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina quando combinado ou não com vancomicina ou ciprofloxacina.** II Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. Florianópolis-SC: [s.n.]. 2010.
- PALOMINO, J. C. ; *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.
- PATEL, G. ; *et al.* Outcomes of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection and the Impact of antimicrobial and Adjunct Therapies. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, p. 1099-1106, 2008.
- PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology**, v. 18, p. 657-686, 2005.
- PITOUT, J. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. **Review of Anti-Infective Therapy**, v. 6, p. 657-669, 2008.
- POZZATTI, P. ; *et al.* In vitro activity of essential oil extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp.. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 950-956, 2008.

- RICE, L. J. ; *et al.* Plectranthus: A plant for the future?. **South African Journal of Botany**, p. 1-13, 2011.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana**: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005.
- SANTOS FILHO, L. **Manual de Microbiologia Clínica**. 3. ed. [S.l.]: Universitária, 2003. 94-97 p.
- SCHWABER, M. J. ; *et al.* Clinical and Economic Impact of bacteremia with Extend-Spectrum – β Lactamase – producing Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1257-1262, 2006.
- SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.
- SILVEIRA, S. A. ; *et al.* Prevalência e Suscetibilidade Bacteriana em Infecções do Trato Urinário de Pacientes Atendidos no Hospital Universitário de Uberaba. **RBAC**, v. 42, n. 3, p. 157-160, 2010.
- SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.
- ULLAH, F. S. A.; MALIK, J. Antimicrobial susceptibility pattern and ESBL prevalence in *Klebsiella pneumoniae* from urinary tract infections in the North West of Pakistan. **African Journal of Microbiology**, v. 3, p. 676-680, 2009.
- VAGIONAS, K. ; *et al.* Chemical analysis of edible aromatic plants growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v. 2, p. 105-111, 2007.

APÊNDICE

APÊNDICE

*Análise cromatográfica do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus**

Figura A - 1 Composição química do óleo essencial das folhas de *P. amboinicus* obtida em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM) Shimadzu, modelo (QP5050A).

Retenção (tempo/min)	Compostos	(%)	Índice de Kovats
16,80	4-Terpineol	1,34	1177
21,39	Carvacrol	90,55	1298
25,46	β -Cariofileno	3,09	1417
25,97	α -Bergamoteno	1,78	1433
30,97	Óxido de cariofileno	1,36	1583
	Total	98,12	

As figuras seguintes mostram os espectros de massas de cada constituinte isoladamente:

Figura A - 2 Espectro de massas do 4-terpineol.

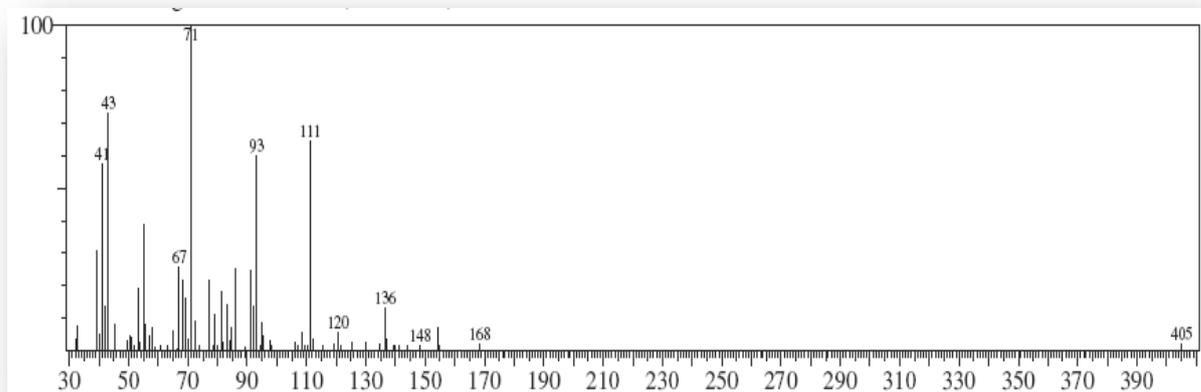


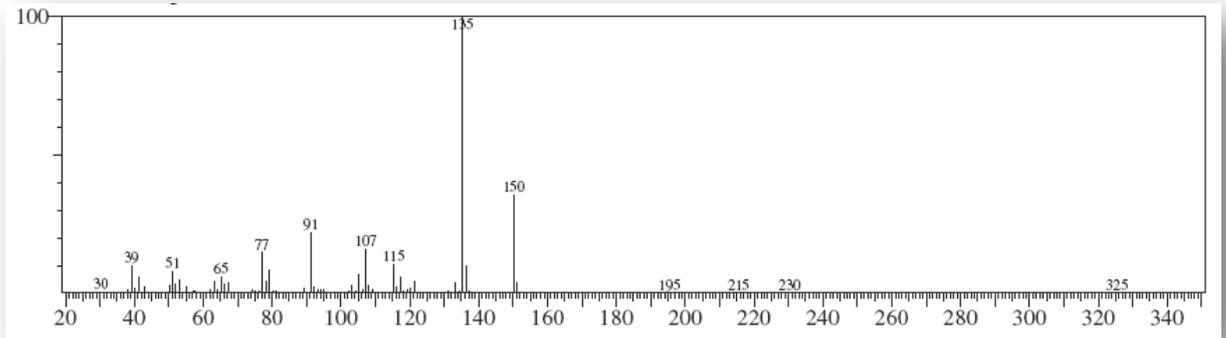
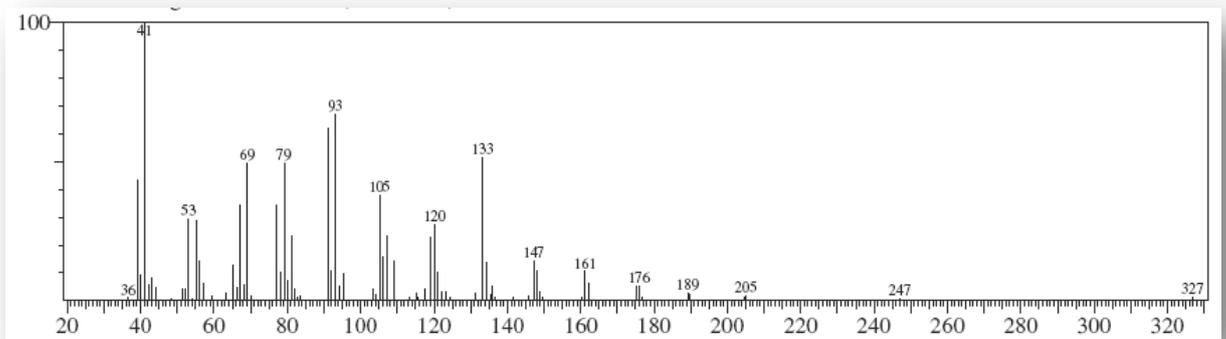
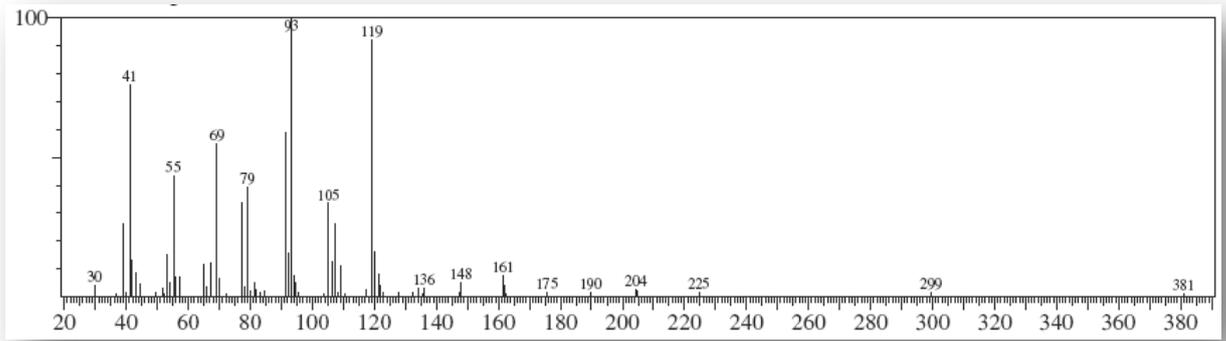
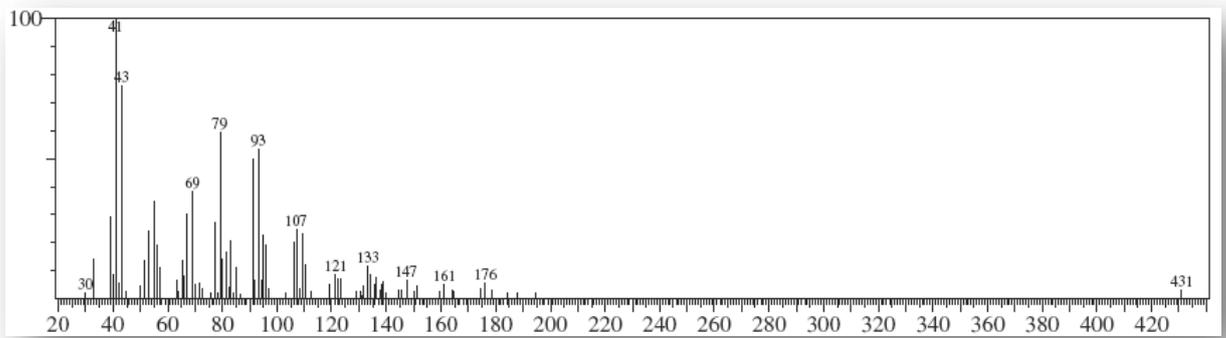
Figura A - 3 Espectro de massas do carvacrol**Figura A - 4** Espectro de massas do β -cariofileno.

Figura A - 5 Espectro de massas do α -Bergamoteno**Figura A - 6** Espectro de massas do oxido de cariofileno

Outros resultados

Inicialmente o estudo foi realizado avaliando-se ação do óleo essencial de *P. amboinicus* frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Como os resultados com *K. pneumoniae* foram já muito promissores, decidiu-se por aprofundar os estudos avaliando-se alguns mecanismos de ação do óleo essencial contra *K. pneumoniae*. A seguir encontram-se os resultados obtidos para *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *E. faecium*.

Figura A - 7 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima de *P. amboinicus* para *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Pseudomonas aeruginosa*.

<i>E. faecalis</i>			<i>E. faecium</i>		
Cepa	CIM <i>P. amboinicus</i>	CIM Vancomicina	Cepa	CIM <i>P. amboinicus</i>	CIM Vancomicina
E3	0,08%	2µg/mL	Efa1	0,04%	32µg/mL
E4	0,08%	2µg/mL	<i>E. faecium</i>	0,16%	8µg/mL
E6	0,08%	2µg/mL			
E12	0,08%	4µg/mL			
E13	0,08%	2µg/mL			
ATCC	0,04%	8µg/mL			

P. aeruginosa

Cepa	CIM <i>P. amboinicus</i>	CIM Ciprofloxacina
P5	0,08%	4µg/mL
P10	0,08%	4µg/mL
P15	0,08%	2µg/mL
P16	0,08%	4µg/mL
P17	0,04%	4µg/mL
ATCC	0,08%	0,25µg/mL

ENSAIO DE PH

Figura A - 8 Efeito do pH na ação do óleo essencial de *P. amboinicus* para *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *E. faecium*

pH	<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>	
	Óleo	Ciprofloxacina	Óleo	Vancomicina	Óleo	Vancomicina
5,5	0,08	4µg/mL	0,04	16µg/mL	0,04	16µg/mL
6	0,08	4µg/mL	0,04	16µg/mL	0,04	16µg/mL
6,5	0,08	4µg/mL	0,04	16µg/mL	0,04	16µg/mL
7	0,08	4µg/mL	0,04	8µg/mL	0,04	16µg/mL
7,5	0,04	2µg/mL	0,02	8µg/mL	0,02	8µg/mL
8	0,04	2µg/mL	0,02	8µg/mL	0,02	8µg/mL
8,5	0,04	1µg/mL	0,02	8µg/mL	0,02	8µg/mL
9	0,04	1µg/mL	0,02	8µg/mL	0,02	8µg/mL

CINÉTICA DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO BACTERIANO

Figura A - 9 Ação bactericida do óleo essencial de *P. amboinicus* contra *Enterococcus faecalis*.

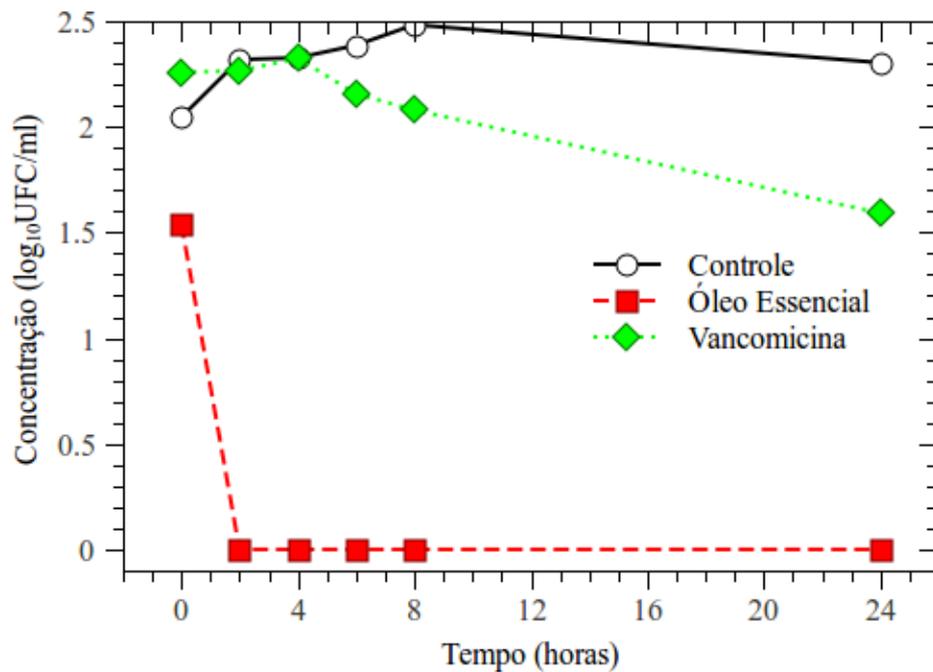


Figura A - 10 Ação bactericida do óleo essencial de *P. amboinicus* contra *Enterococcus faecium*.

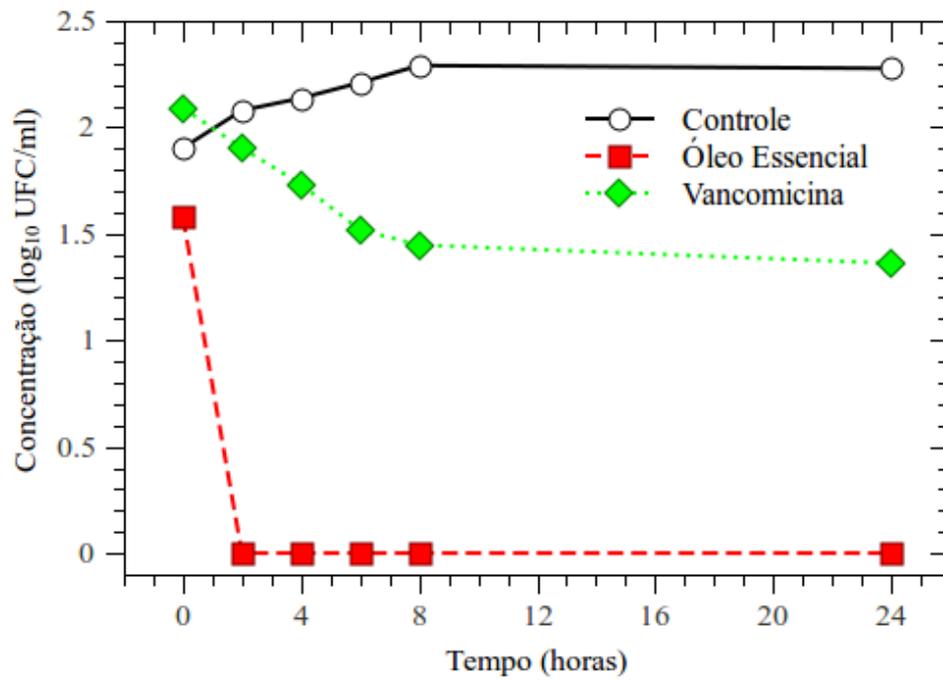


Figura A - 11 Ação bactericida do óleo essencial de *P. amboinicus* contra *Pseudomonas aeruginosa*.

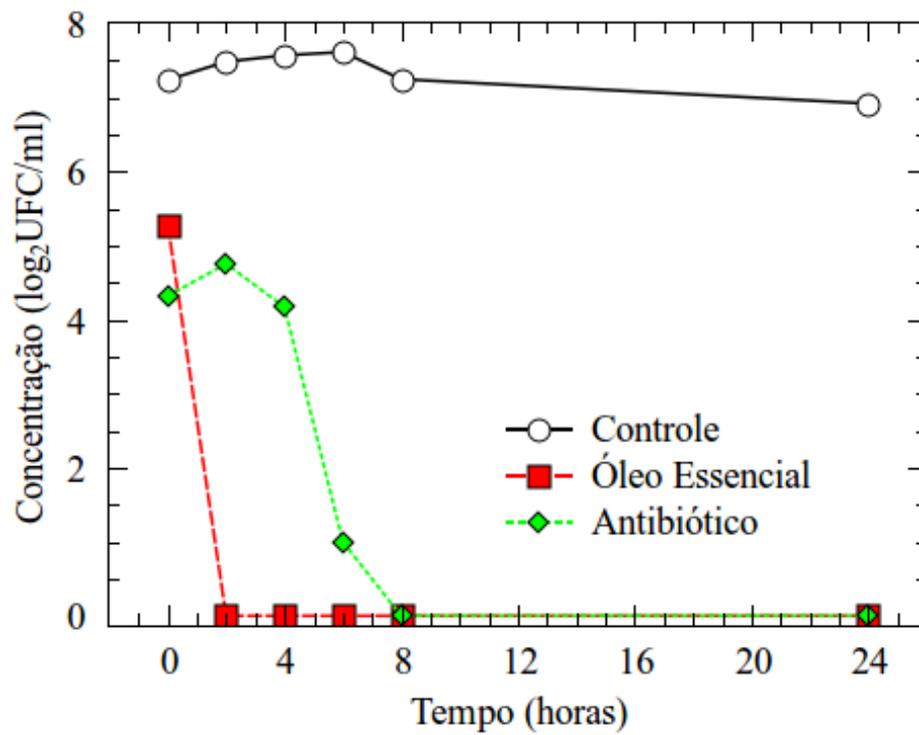


Figura A - 12 Captação de cristal violeta por *Enterococcus faecalis* previamente incubado com óleo essencial de *P. amboinicus*.

Grupos	PBS	EDTA	VANCO	Óleo essencial	
				CIM	CIM
($x_{Abs} \pm ME$)	0.364 ± 0.008	0.285 ± 0.016	0.303 ± 0.009	0.334 ± 0.018	0.300 ± 0.018
IC ₉₅	0.342 ± 0.387	0.240 ± 0.330	0.278 ± 0.330	0.285 ± 0.383	0.250 ± 0.350
<i>p</i>	N.S.	< 0.01 (vs PBS)	N.S.	N.S.	< 0.05 (vs PBS)

x_{Abs} , Média da Absorbancia; IC, intervalo de confiança; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; ME, média de erro; CIM, Concentração Inibitória Mínima; N.S., não significante; PBS, phosphate-buffered saline; vs, versus; VANCO, vancomicina.

Figura A - 13 Captação de cristal violeta por *Enterococcus faecium* previamente incubado com óleo essencial de *P. amboinicus*.

Grupos	PBS	EDTA	VANCO	Essential oil	
				MIC	2 x MIC
($x_{Abs} \pm ME$)	0.337 ± 0.004	0.310 ± 0.005	0.333 ± 0.017	0.328 ± 0.015	0.309 ± 0.015
IC ₉₅	0.325 ± 0.349	0.298 ± 0.325	0.285 ± 0.388	0.297 ± 0.381	0.253 ± 0.341
<i>p</i>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

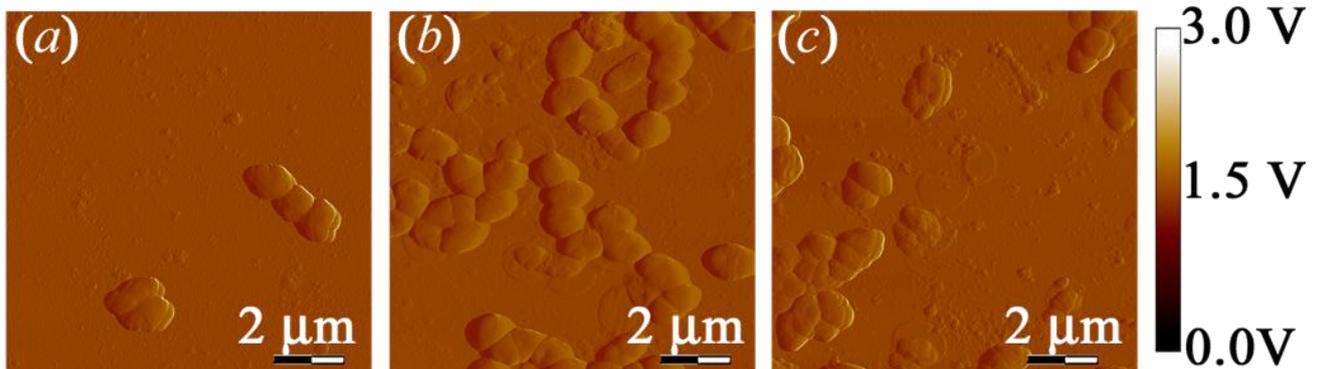
x_{Abs} , Média da Absorbancia; IC, intervalo de confiança; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; ME, média de erro; CIM, Concentração Inibitória Mínima; N.S., não significante; PBS, phosphate-buffered saline; vs, versus; VANCO, vancomicina.

Figura A - 14 Captação de cristal violeta por *Pseudomonas aeruginosa* previamente incubado com óleo essencial de *P. amboinicus*.

Grupos	PBS	EDTA	CIPRO	Óleo essencial	
				CIM	2 x CIM
Número de amostras	5	5	5	5	5
($\bar{x}_{Abs} \pm EM$)	0.471 \pm 0.040	0.443 \pm 0.026	0.440 \pm 0.021	0.419 \pm 0.038	0.332 \pm 0.028
CI ₉₅	0.361 \pm 0.581	0.371 \pm 0.514	0.382 \pm 0.499	0.313 \pm 0.525	0.254 \pm 0.410
<i>p</i>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	< 0.05 (vs PBS)

xAbs Média de absorbância; CIPRO, ciprofloxacina, IC, intervalo de confiança; EDTA, ácido Etilenodiaminotetracético; EM, significa erro; CIM, Concentração Inibitória Mínima, NS, Não significativo; PBS, Tampão fosfato; vs, Versus.

Figura A - 15 Imagem de *E. faecalis* obtida através de Microscopia de Força Atômica (MFA). Representado por (a) Controle; (b) 1X CIM e (c) 2X CIM.



ANEXOS

Identificação bacteriana manual da família Enterobacteriaceae

Figura A - 16 Identificação bacteriana manual da família Enterobacteriaceae

BACTÉRIA	Gás	Lac	H ₂ S	Ure	Ind	Mob	Orn	Lis	Cit	Fal
<i>E. coli</i>	+	+	-	-	+	+/-	+/-	+	-	-
<i>Shigella (a,b,c)</i>	-	-	-	-	-/+	-	-/+	-	-	-
<i>S. sonnei (d)</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Salmonella spp</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>S. typhi</i>	-	-	+/-	-	-	+	-	+	-	-
<i>C. freundii</i>	+	-/+	+	+/-	-	+	-/+	-	+	-
<i>C. diversus</i>	+	-/+	-	+/-	+	+	+	-	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>K. oxytoca</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>E. aerogenes</i>	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>E. cloacae</i>	+	+	-	+/-	-	+	+	-	+	-
<i>Serratia spp.</i>	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+	-
<i>P. vulgaris</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-/+	+
<i>P. mirabilis</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	+/-	+
<i>P. penneri</i>	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>P. rettgeri</i>	-/+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>P. stuartii</i>	-	-	-	-/+	+	+	-	-	+	+
<i>M. morgani</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>Edwardsiella</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-	+/-	+/-	-	+	-	-	-

LEGENDA:

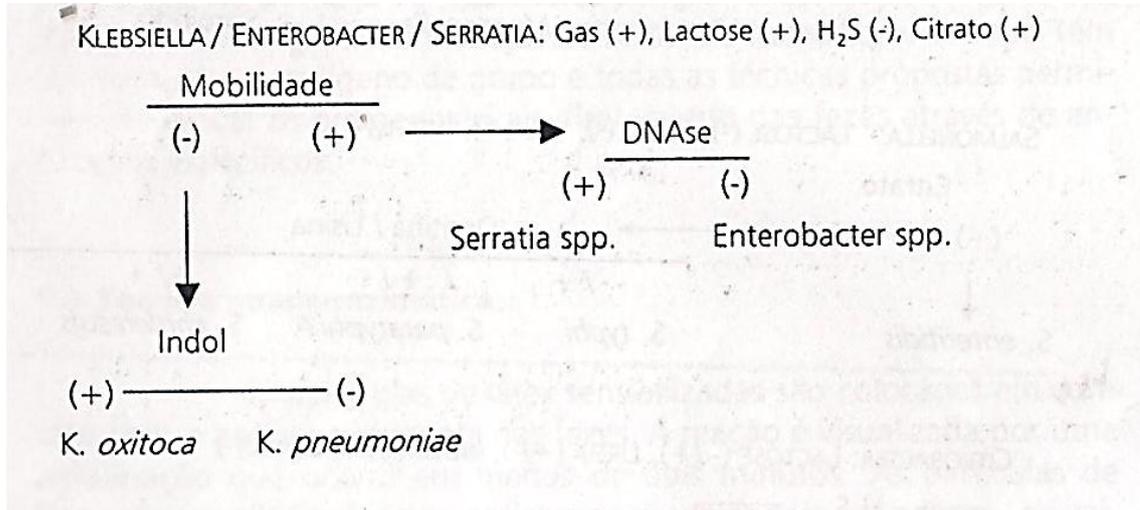
Gás = Gás (CO ₂)	URE = Uréia	ORN = Ornitina
LAC = Lactose	IND = Indol	LIS = Lisina
H ₂ S = Gás Sulfídrico	MOB = Mobilidade	FAL = Fenilalanina

+ Positivo > 90% - Negativo > 90%
 +/- Positivo 50 a 90% -/+ Negativo 50 a 90%

Fonte: SANTOS, 2003.

Identificação bioquímica simplificada

Figura A - 17 Identificação bioquímica simplificada



Fonte: SANTOS, 2003.

Preparo do óleo essencial, Meios de Cultura e Reagentes

PREPARO DA CONCENTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

DMSO (DIMETILSULFÓXIDO - VETEC):

DMSO p.a	30mL
Água destilada	1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C.

ÓLEO ESSENCIAL (2,5%):

Óleo essencial de <i>P. amboinicus</i>	0,25mL
DMSO 3%	10mL

Manter a 4°C.

MEIOS DE CULTURA EM FORMA DESIDRATADA

BRAIN HEART INFUSION BROTH (BHI – Oxoid):

Meio BHI desidratado	37g
Água destilada	1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C, distribuir em tubos ou frascos estéreis.

MUELLER HINTON BROTH (MH Caldo – Oxoid):

Meio Mueller Hinton desidratado	21g
Água destilada	1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C, distribuir em tubos ou frascos estéreis.

MAC CONKEY AGAR (Merck):

Meio Mac Conkey desidratado	50g
Água destilada	1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C, distribuir em tubos ou frascos estéreis.

CALDO LEITE (ENRIQUECIMENTO DA CÁPSULA BACTERIANA):

Leite desnatado	9,5g
Água destilada	1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C, distribuir em tubos ou frascos estéreis.

CALDO UREIA (MEIO URÉIA DE STUART):

Extrato de levedura	0,1g
Fosfato monopotássico	9,1g
Fosfato dissódico	9,5g
Ureia	20g
Vermelho fenol	0,01g
Água destilada	1000mL

REAGENTES**RESAZURINA (SIGMA – 0,05%):**

Resazurina	0,05g
Água destilada	100mL

Esterilizar por filtração.

TAMPÃO PBS

Cloreto de sódio (Reagen)	8,0g
Fosfato monobásico de Potássio (Qeel)	0,2g
Fosfato bibásico de sódio Dodecahidratado (Ecibra)	2,8g
Cloreto de potássio (Nuclear)	0,2g
Água destilada	1000mL

Acertar o pH 7,4 com HCl 6N

SOLUÇÃO SALINA 0,9%:

Cloreto de sódio(VETEC)	9g
Água destilada	1000mL

SOLUÇÃO PBS-CRISTAL VIOLETA (10µg/mL – ENSAIO DE CAPTAÇÃO DO CRISTAL VIOLETA):

Cristal violeta	1g
PBS	100mL

Esterilizar por filtração.

CRISTAL VIOLETA 1% (ENSAIO DA CÁPSULA):

Cristal violeta	1g
Água destilada	100mL

Esterilizar por filtração.

SULFATO DE COBRE 20% (ENSAIO DA CÁPSULA):

Sulfato de cobre	20g
Água destilada	100MI