



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

RAISSA XIMENES LIMA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE TERPENOS E
ANTIBIÓTICOS CONVENCIONAIS E SUAS ASSOCIAÇÕES
FRENTE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORAS DE
CARBAPENEMASE

Recife

2018

RAISSA XIMENES LIMA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE TERPENOS E
ANTIBIÓTICOS CONVENCIONAIS E SUAS ASSOCIAÇÕES
FRENTE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORAS DE
CARBAPENEMASE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito
parcial para a obtenção do título de
Mestra em Patologia.

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Recife

2018

Catálogo na fonte:

Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

L732a Lima, Raissa Ximenes.

Atividade antimicrobiana de terpenos e antibióticos convencionais e suas associações frente *klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase / Raissa Ximenes Lima. – Recife: o autor, 2018.

49 f.; 30 cm.

Orientadora: Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Patologia.

Inclui referências.

1. Carbapenemase. 2. Terpenos. 3. Enterobacteriaceae. I. Ximenes, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo (orientadora). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 286)

RAISSA XIMENES LIMA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE TERPENOS E
ANTIBIÓTICOS CONVENCIONAIS E SUAS ASSOCIAÇÕES
FRENTE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUTORAS DE
CARBAPENEMASE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito
parcial para a obtenção do título de
Mestre em Patologia.

Aprovada em: 16/ 03/ 2018

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Orientador)

Profº. Dra. Rejane Pereira Neves (Examinador Interno)

Profº. Dra. Mônica Pessoa de Azevedo Albuquerque (Examinador Externo)

Profº. Dr. Kledoaldo Oliveira de Lima (Examinador Externo)

À memória de minha avó, sinônimo de amor.

RESUMO

A prevalência de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC) aumentou na última década, principalmente em ambiente hospitalar. Essas bactérias causam infecções graves e são resistentes a vários antibióticos, incluído β -lactâmicos e carbapenêmicos. As taxas de mortalidade são elevadas e a terapia é limitada ao uso de aminoglicosídeos, tigeciclina e polimixinas. Devido ao aumento da resistência microbiana a múltiplos fármacos, as pesquisas para aplicar novas terapias e obter novos fármacos são necessárias. Os compostos de origem natural representam uma fonte importante na obtenção de substâncias com atividades biológicas. Desta forma, o primeiro objetivo deste estudo foi avaliar pelo método de microdiluição em caldo, a atividade antimicrobiana de terpenos (citról, linalol e eucaliptol) e antimicrobianos convencionais (amicacina, gentamicina, tigeciclina e polimixina B) contra nove isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Em seguida, com o terpeno mais eficaz foram avaliadas as interações terpenos/antimicrobianos através do ensaio do *checkerboard*. Para isso foram utilizados os valores do Índice de concentração fracionada (ICIF) classificando assim as associações em sinérgicas, aditivas, indiferentes ou antagônicas. A detecção fenotípica e genotípica para a produção da carbapenemase também foram objetivadas. Todas as cepas foram positivas para a presença da carbapenemase detectada através do teste de Hodge. Apenas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e LFBM 07 não expressaram o gene *bla*_{KPC}. Dentre os terpenos avaliados o linalol foi mais eficaz, apresentando valores da CIM igual a 512 μ g/mL. As combinações linalol com os agentes antimicrobianos foram sinérgicas para todas as cepas avaliadas, cujos ICIF variaram de 0,16 a 0,31. A associação linalol-tigeciclina (CIFI 0,16) mostrou ser a mais eficaz dentre as demais, com redução percentual da CIM 87,5% e 96,8% para linalol e tigeciclina, respectivamente. Esse estudo mostrou que o linalol quando combinado a aminoglicosídeos, polimixina B e tigeciclina apresentam efeito sinérgico, inibindo as cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase.

Palavras-chave: Carbapenemase. Terpenos. Enterobacteriaceae.

ABSTRACT

The prevalence of *Klebsiella pneumoniae* producing of carbapenemase (KPC) increased in the last decade. These microorganisms are resistant to most β -lactam antibiotics including carbapenems and cause serious infections, mainly pneumonia, intraabdominal and urinary. The mortality rates are high and therapy is limited to aminoglycosides, tigecycline and polymyxins. Due to the increased microbial resistance to multiple drugs, researches for new conducts therapeutics and new drugs are necessary. Natural compounds represent an important source for obtaining substances activity biologically. Thus, the first objective of the study was to evaluate by the microdilution method the antimicrobial activity of three terpenes (citral, linalool and eucalyptol) and antimicrobials (amikacin, gentamicin, tigecycline and polymyxin B) against nine clinical isolates of *K.pneumoniae*. Then, with the terpene most effective evaluated the terpene / antimicrobial interactions through the checkerboard test. For this, the values of the Fractionated Concentration Index (FICI) were used, thus classifying the associations in synergic, additive, indifferent or antagonistic. The phenotypic and genotypic detection for the production of carbapenemase were also objectified. All strains were positive for the presence of carbapenemase detected by the Hodge test. Only *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and LFBM 07 did not express the *bla_{KPC}* gene. Among the terpenes evaluated, linalool was more effective, with MIC values equal to 512 μ g / mL. Linalool combinations with antimicrobial agents were synergistic for all strains evaluated, FICI ranged from 0.16 to 0.31. The association linalool-tigecycline (FICI 0.16) was shown to be the most effective among the others, with a percentage reduction of CIM 87.5% and 96.8% for linalool and tigecycline, respectively. This study showed that linalool when combined with aminoglycosides, polymyxin B and tigecycline showed a synergistic effect, inhibiting *K. pneumoniae* strains producing carbapenemase.

Keywords: Carbapenemase. Terpenes. Enterobacteriaceae.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
2.2	Fatores de Virulência em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
2.2.1	Cápsula polissacarídica	11
2.2.2	Lipopolissacarídeo	11
2.2.3	Sideróforos	12
2.2.4	Fímbrias	13
2.2.5	Biofilme	13
2.3	Elementos relacionados à resistência em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
2.3.1	Carbapenemase tipo KPC	15
2.4	Tratamento	16
2.4.1	Aminoglicosídeos	16
2.4.2	Polimixinas	19
2.4.3	Glicilciclinas	20
2.5	Terpenos	21
2.5.1	Linalol	22
2.5.2	Citral	23
2.5.3	Eucaliptol	23
2.6	Associações Farmacológicas	24
3	OBJETIVO	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Microrganismos	26
4.2	Culturas, manutenção e padronização do inóculo	26
4.3	Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos	26
4.4	Determinação fenotípica da presença da enzima carbapenemase - Teste de Hodge Modificado	27
4.5	Determinação genotípica da produção da carbapenemase - Reação em cadeia da polimerase (PCR)	28

4.6 Terpenos e antimicrobianos convencionais	29
4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	30
4.8 Determinação da Concentração inibitória fracionada (Ensaio de <i>Checkerboard</i>)	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae produtoras de carbapenemases é um patógeno associado a diversas infecções, das quais incluem pneumonias, infecções do trato genito urinário, abscessos hepáticos e septicemias. Por se tratar de um microrganismo oportunista, acomete em especial, pacientes imunocomprometidos, estando associados principalmente a infecções nosocomiais (Wang, 2018).

Por causar infecções graves muitas vezes aumentando o risco de morte, as infecções causadas por *K.pneumoniae* tornam-se um desafio à clínica devido a falta de uma terapia eficiente (Tumbarello, et al , 2015). O mecanismo de resistência frequentemente encontrado em *K.pneumoniae* é a produção da carbapenemase, enzima a qual é produzida por microrganismos gram negativos e confere resistência aos carbapenêmicos, classe amplamente utilizada no tratamento de infecções por enterobactérias, assim como possuem a capacidade de hidrolisar cefalosporinas e monobactâmicos.

Devido à resistência aos carbapenemicos as opções de tratamento para *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases tornam-se ainda mais limitadas. Atualmente são utilizadas terapias combinadas entre polimixinas B, tigeciclina e aminoglicosídeos como amicacina e gentamicina (Lee et al, 2016). A criação de novos compostos o qual contenha uma boa atividade antimicrobiana se faz necessário, bem como novos mecanismos de ação, uma alternativa seria os terpenos.

Os terpenos são metabólitos secundários de origem natural que são encontrados em uma diversidade de plantas e são os principais componentes dos óleos essenciais, desempenham diversas funções, entre elas mecanismo de defesa contra herbívoros e patógenos (Vieira, 2018). São compostos por uma unidade de isopreno (C_5H_8) e desempenham uma variedade de ações biológicas como: antileishmanial, anticonvulsivante, anti-inflamatória, sedativa, antinociceptiva e antimicrobiana (Rosa, 2003, Alviano, 2005; Batista, 2008; Chang et al, 2014; Yang et al 2014).

Diante do exposto acima, o presente trabalho tem como objetivo avaliar atividade antimicrobiana de terpenos (cital, linalol e eucaliptol) e antimicrobianos convencionais (amicacina, gentamicina, polimixina B, tigeciclina) e suas associações frente cepas de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* positiva.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é um patógeno gram negativo que pertence à família *Enterobacteriaceae* (Martin et al, 2018).

Suas características bioquímicas são: reação à oxidase, fermentador de lactose, utilizam o citrato como fonte de carbono, hidrolisam a uréia, lisina positiva e indol e ornitina negativas. Em meio de cultura sólido produzem colônias grandes rosadas, de aparência brilhante e em geral mucosa devido a presença de cápsula polissacarídica que auxiliam contra a fagocitose por macrófagos assim como auxiliam na aderência da bactéria ao hospedeiro (Koneman et al, 2008).

Nos seres humanos colonizam principalmente o trato gastrointestinal, nasofaringe e pele. *Klebsiella pneumoniae* é a espécie mais relevante clinicamente, sendo responsável por 70% das infecções humanas. São responsáveis por infecções nosocomiais, principalmente infecções do trato urinário, respiratório e associados a circulação sanguínea (Pitout et al., 2015).

É considerado um microrganismo oportunista, causando infecções em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos (Martin et al, 2018). O tipo de infecção nosocomial mais prevalente ocasionado por *K.pneumoniae* ocorre em unidade de terapia intensiva (UTI), onde 97% estão associadas a presença de cateteres urinários (Chung et al, 2016)

O aumento de infecções causadas por *K.pneumoniae* são motivos de preocupação global, e torna-se mais preocupante quando essas cepas possuem resistência a agentes antimicrobianos (Chung et al, 2016). Diversos fatores contribuem para a disseminação da resistência aos antibióticos como o uso inadequado de antibióticos e a falta de novos antimicrobianos na terapêutica (Martin et al, 2018)

2.2 Fatores de Virulência em *Klebsiella pneumoniae*

A capacidade de adaptação permite que *Klebsiella pneumoniae* supere a detecção pelo sistema imunológico do hospedeiro. *K.pneumoniae* utiliza uma variedade de fatores de virulência a fim de melhorar sua invasão e romper as defesas do hospedeiro (Gomez-Simmonds et al, 2017). Existem 4 classes principais de fatores de virulência caracterizados em *K.pneumoniae*, são eles: cápsulas polissacarídicas, lipopolissacarídeos, sideróforos e fímbrias (Paczosa et al, 2017).

2.2.1 Cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica é o fator de virulência mais complexo em *Klebsiella pneumoniae*. As cepas de *K.pneumoniae* também produzem uma hipercápsula que consiste em um revestimento bacteriano mucoviscoso de exopolissacarídeo, o qual pode contribuir significativamente para patogenicidade de *K.pneumoniae* (Paczosa et al, 2017).

Tanto a cápsula quanto a hipercápsula são formados por polissacarídeos capsulares de denominados de antígenos K. Essa cápsula é codificada pelo locus CPS, o qual é altamente variável, resultando em diferentes fenótipos clínicos (Gomez Simmonds et al, 2017). São reconhecidos pelo menos 78 sorotipos capsulares (K1 a K78) em *K.pneumoniae*. Alguns sorotipos (K1 e K2) apresentam um fenótipo hipervirulento devido ao aumento da produção de polissacarídeos, cepas que apresentam esses sorotipos podem afetar pessoas saudáveis causando abscessos hepáticos piogênicos, meningites e pneumonias (Li et al, 2014).

A presença da cápsula polissacarídica protege *K.pneumoniae* da opsonização e fagocitose por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e epiteliais. Dificulta a ação bactericida de peptídeos antimicrobianos como beta defensinas humanas 1 e 3, bloqueia os componentes do complemento como C3 de interagir com a membrana e dessa forma evita lise e opsonização e evita a ação da resposta imune (Li et al, 2014).

2.2.2 Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo é um componente necessário e importante do folheto externo da membrana celular de microrganismos gram negativos. O lipopolissacarídeo pode atuar como

ativador imunológico ou como um importante fator de virulência contra as defesas humanas. São codificados por genes nos clusters do gene *wb*, *waa* e *lpx*. Foram identificados 9 antígenos para isolados de *K.pneumoniae* onde o O1 é o mais frequente (Paczosa et al, 2017).

O lipopolissacarídeo é composto por 3 partes: o lipídeo A o qual é hidrofóbico e encontra-se ancorado na membrana externa. O antígeno O é altamente variável e o componente mais externo do lipopolissacarídeo e o polissacarídeo do núcleo o qual liga o lipídeo A ao antígeno (Li et al, 2014). *K.pneumoniae* pode modificar o lipídeo A, com a finalidade de torná-lo menos inflamatório durante o processo infeccioso e também proteger contra a ação bactericida de peptídeos antimicrobianos. O antígeno O tem o papel importante na proteção frente ao sistema complemento (Paczosa et al, 2017).

2.2.3 Sideróforos

Os sideróforos são moléculas que possuem mais afinidade pelo ferro do que as moléculas do hospedeiro. Durante a infecção o ferro é um recurso adquirido por *K.pneumoniae*, no entanto esse metal não se encontra prontamente disponível no hospedeiro. Normalmente há pouco ferro livre no plasma do hospedeiro e sua quantidade ainda é reduzida durante infecções (Paczosa et al, 2017).

Os sideróforos permitem a absorção de ferro em células bacterianas durante a infecção. Atualmente 3 sideróforos foram implicados na virulência de *K.pneumoniae*: Yersiniabactina: é considerado um dos genes mais comuns em *K.pneumoniae* e está associado a infecções do trato urinário em seres humanos assim como a promoção da colonização e infecção do trato respiratório através da elevação da lipocalina 2, uma proteína da imunidade inata. Enterobactina: tem papel importante no crescimento sob condições de ferro limitadas e Aerobactina: é expresso em células hipervirulentas.

Outros genes os quais participam do metabolismo do ferro também estão associados na virulência em *K.pneumoniae* como o *Kfu*, que se encontra envolvido na aquisição de ferro e infecções invasivas (Gomez Simmonds et al, 2017).

2.2.4 Fímbrias

As fímbrias representam uma classe de fatores de virulência em *K.pneumoniae* importantes na adesão. Em *K.pneumoniae* as fímbrias do tipo 1 e 3 são as principais estruturas adesivas (Paczosa et al, 2017). São componentes da membrana celular de *K.pneumoniae* e desempenham papel importante na interação bactéria-hospedeiro; superfícies bióticas, abióticas e tecidos (Gomez Simmonds et al, 2017).

As fímbrias do tipo 1 são codificados por um operão *fim* enquanto fímbrias do tipo 3 são do tipo hélice e codificados pelo *mrk* (Vuotto et al, 2014). Encontradas frequentemente na família *Enterobacteriaceae* as fímbrias do tipo 1 são expressas em 90% dos isolados clínicos de *K.pneumoniae* (Paczosa et al, 2017).

As fímbrias tipo 1 são sensíveis a manose se estendem até a cápsula e dessa forma mediam a adesão bacteriana às estruturas que possuem manose na célula hospedeira ou na matriz extracelular através da adesina *fimH* (Li et al, 2014).

As fímbrias do tipo 3 são resistentes a manose e caracterizadas como anexos de 2 a 4 nm de largura e 0,5 a 2 µm de comprimento. A subunidade adesiva é codificada por *mrkD* o qual possui a capacidade de se ligar a moléculas de colágeno na matriz extracelular e atuam como um dos principais constituintes na formação do biofilme (Li et al, 2014).

2.2.5 Biofilme

A formação do biofilme é considerada um fator importante na patogênese de *K.pneumoniae*, em especial em casos isolados em UTI. O biofilme pode ser descrito como uma comunidade complexa tridimensional composta por microrganismos aderidos em uma superfície que pode ser biótica ou abiótica envolvida por uma matriz de exopolissacarídeo (EPS) que possui a função de proteger os microrganismos existentes no meio interno contra as possíveis agressões do meio externo (Jamal et. al, 2017; Costa et al., 2014).

A formação é complexa e envolve estágios como adesão, produção de microcolônias, formação do biofilme maduro e destacamento (Clegg et al, 2016). Acredita-se que a formação do biofilme seja um mecanismo de resistência, uma vez que formado o biofilme as bactérias são resguardadas da defesa do hospedeiro, além do que o biofilme é mais resistente a ação de

antibióticos. Essa resistência pode ser atribuída à espessura densa da matriz composta por polissacarídeos, proteínas e DNA que evitam a difusão dos antimicrobianos e diminuem a exposição de bactérias (Clegg et al, 2016).

Durante o processo de adesão o biofilme aumenta de espessura. Normalmente, a espessura da matriz de exopolissacarídeo é de 0,2 -1,0 μm , entretanto o tamanho do biofilme não ultrapassa 10-30 nm. Cerca de 5 a 35% do volume do biofilme é constituído por microrganismos, sendo o restante composto pela matriz extracelular, a qual é constituída principalmente de proteína (Jamal et. al, 2017).

2.3 Elementos relacionados à resistência em *Klebsiella pneumoniae*

Em bactérias gram negativas o principal mecanismo de resistência é a produção de β -lactamases (Nass, et al 2016). As β -lactamases são capazes de hidrolisar o anel β lactâmico através da hidroxilação irreversível do grupo amina, desta forma o antimicrobiano perde a capacidade de ação (Abrantes et al, 2017).

Representando a família mais versátil de β -lactamases, as carbapenemases possuem um extenso espectro de hidrólise para os antibióticos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos. As carbapenemases são classificadas conforme suas propriedades funcionais e moleculares (Vera-Leiva et al, 2017).

Atualmente existem duas classificações mais utilizadas para a produção de carbapenemases: a classificação de Ambler a qual é baseada na sequência de aminoácidos, agrupando-os de acordo com a estrutura molecular da β -lactamase e a classificação de Bush que é baseada na correlação entre substrato e as propriedades inibitórias das enzimas (Abrantes,et al 2017).

De acordo com Bush as carbapenemases são encontradas nos grupos 2df, 2f e 3, enquanto na classificação de Ambler, essas enzimas são incluídas na classe A, B e D. As classes A e D são compostas por β -lactamases que possuem um resíduo de serina em seu local ativo, sendo consideradas serina- β -lactamases, enquanto que as enzimas de classe B possuem como cofator enzimático um ou dois íons de zinco, sendo consideradas metalo- β -lactamases. (Vera-Leiva et al, 2017).

Na classe A de Ambler estão as carbapenemases que possuem maior diversidade e distribuição. Foram identificados em *Enterobacteriaceae* (Vera-Leiva et al, 2017). Nesta classe estão classificadas as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) que são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam e estão incluídas no grupo 2 de Bush (Nass et al, 2016). As principais carbapenemases de classe A são: NMC (“*not metallo enzyme carbapenemase*”), IMI (“*imipenem-hydrolyzing β -lactamase*”), SME (“*Serratia marcescens enzyme*”), GES (“*Guiana extended spectrum*”) e KPC (“*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*”) (Vera-Leiva et al, 2017).

Na classe B estão as metalobetalactamases, que possuem capacidade de hidrolisar carbapenens, com exceção do aztreonam e tem sua ação inibida pelo EDTA (ácido etileno-diamino-tetra- acético) fazem parte do grupo 3 de Bush (Abrantes et al, 2017). As principais metaloenzimas são: VIM (“*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*”), GIM (“*German imipenemase*”), SIM (“*Seoul imipenemase*”), IMP (“*active on imipenem*”) e NDM (“*New Delhi metallo-beta-lactamase*”) (Vera- Leiva et al, 2017).

As oxacilinas compõem a classe D e pertencem ao grupo funcional 2d. São capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e carbapenens e aumentam a capacidade de hidrolisar oxacilina e cloxacilina (Vera-Leiva et al, 2017).

2.3.1 Carbapenemase tipo KPC

As enzimas do tipo KPC foram descritas pela primeira vez por Yigit *et al.* (2001) em um isolado de *K. pneumoniae* datado de 1996 na Carolina do Norte, Estados Unidos no projeto Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE). No Brasil a primeira notificação da enzima ocorreu em 2009 em um estudo realizado pela vigilância sanitária o qual possuíam amostras do período de 2003 a 2008, foi então confirmada a presença de KPC em São Paulo (Monteiro et al, 2009).

As carbapenemases do tipo KPC são as carbapenemases de classe A de Ambler mais prevalentes no mundo. Possuem a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. São parcialmente inibidos pelo ácido clavulânico e tazobactam (Escandnvargas et al, 2016)

As KPCs são enzimas codificadas por plasmídeos e são suscetíveis apenas a alguns antibióticos como polimixina, aminoglicosídeos e colistina. Estão contidas numa região de 879 pb e são proteínas que contém 293 aminoácidos (Du et al., 2014).

O bla_{KPC} em *K. pneumoniae* tem sido detectado em uma variedade de plasmídeos, os quais apresentam tamanhos distintos assim como carregam diferentes determinantes de resistência aos antibióticos e pertencem a diferentes grupos de incompatibilidade (Inc) como IncF, IncI2, IncX, IncA / C, IncR, e ColE1 (Pitout et al., 2015; Lee et al, 2016).

Entretanto, o plasmídeo predominante é do tipo IncF com replicões do FIIK o qual é composto por genes adicionais que auxiliam na resistência a diversos antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, tetraciclinas, quinolonas e sulfonamidas (Lee et al, 2016).

Uma grande parte dos genes bla_{KPC} encontram-se associados a estruturas chamadas de transposon Tn4401, encontrado em plasmídeo conjugativos. Esse transposon apresenta um tamanho aproximado de 10kb e é compreendido por duas sequências inversamente repetidas, um gene transposase, um gene resolvase e duas sequências de inserção ISK $pn6$ e ISK $pn7$. Até o momento mais de 30 plasmídeos foram sequenciados contendo o gene bla_{KPC} em *K.pneumoniae* (Lee et al, 2016).

2.4 Tratamento

As infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase ocasionam um problema em grande escala pois essa enzima inibe os carbapenêmicos e são frequentemente resistentes a maioria dos antibióticos β -lactâmicos. As opções terapêuticas tornam o tratamento limitado a polimixinas, tigeciclina e alguns aminoglicosídeos (Lee et al., 2016). *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase é considerado um dos patógenos hospitalares mais importantes afetando principalmente pacientes graves aumentando o risco de morte (Ducomble et al, 2015; Tumbarello et al, 2015).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza o uso de aminoglicosídeos como alternativa para terapia empírica em casos de infecções por enterobactérias multirresistentes, em especial as produtoras de KPC (Anvisa, 2013).

2.4.1 Aminoglicosídeos

Desde a descoberta da estreptomicina em 1944 por Waksman, foram descobertos mais de 200 aminoglicosídeos produzidos por microrganismos do solo como *Streptomyces*, *Bacillus* e *Micromonospora*. Em geral, os aminoglicosídeos possuem um amplo espectro de ação, possuindo atividade frente a microrganismos gram negativos como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp, *Pseudomonas aeruginosa* , assim como gram positivos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* spp. (Takahashi et al, 2017).

Os aminoglicosídeos são compostos policatiônicos, sendo constituídos por um anel aminociclitol ligado a um açúcar e contém pelo menos dois grupos amina e grupos hidroxila livres (Xu et al, 2017). O principal mecanismo de ação envolvido em sua atividade bactericida é a capacidade de se ligar ao sítio A na região decodificadora 16S da subunidade 30S do ribossomo bacteriano e dessa forma gerando falha na tradução e aminoácidos incorretos e consequentemente proteínas aberrantes.

Devido a sua natureza policatiônica, os aminoglicosídeos possuem a capacidade de se ligar a compostos aniônicos presentes na superfície da membrana das bactérias. Em bactérias gram negativas esses compostos são lipopolissacarídeos, fosfolipídeos e proteínas presentes na membrana externa e em bactérias gram positivas esses compostos são fosfolipídios e ácidos teicóicos (Ramirez et al, 2017).

Ao interagir com a membrana, os aminoglicosídeos através de um mecanismo independente de energia conhecido como autopromoção de absorção proporciona um aumento da permeabilidade, que resulta na penetração de algumas moléculas no espaço periplasmático, seguindo de um processo dependente de energia, onde um pequeno grupo de moléculas do antibiótico atinge o citoplasma através do sistema funcional de transporte de elétrons.

Quando as moléculas do aminoglicosídeo estão no citoplasma produzem proteínas aberrantes induzindo danos na a integridade da membrana plasmática, facilitando desta forma a entrada de aminoglicosídeos em grande quantidade.

Foram relatados diversos mecanismos de resistência relacionados aos aminoglicosídeos, entre eles estão as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, mecanismo mais prevalente. A modificação enzimática é mediada por três principais enzimas: acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidotransferases, que são encontradas em bactérias gram positivas e gram negativas. Essas enzimas são responsáveis por modificar um

grupo amino específico ou hidroxila nos aminoglicosídeos (Xu et al, 2017; Takarashi et al, 2017).

Por não serem absorvidos pelo trato gastrointestinal, os aminoglicosídeos são normalmente administrados via parenteral ou tópica e sofrem excreção renal por filtração glomerular. A administração de aminoglicosídeos pode levar a nefrotoxicidade, geralmente reversível e ototoxicidade permanente.

A amicacina é o aminoglicosídeo semissintético derivado da canamicina mais utilizado na clínica. Apresenta-se como uma solução estéril, incolor e límpida, possui fórmula molecular $C_{22}H_{43}N_5O_{13} \cdot 2H_2SO_4$ e peso molecular 781,76 (Anvisa, 2017). É utilizado isolado ou combinado para tratar infecções graves em especial causadas por gram negativos. Por não ser absorvido pelo trato gastrointestinal não existe uma forma oral do medicamento. É administrado principalmente por via intravenosa, intramuscular e por nebulização. No entanto pode ser administrado via intratecal para infecções específicas como meningites. Seu efeito antimicrobiano é considerado ótimo quando a concentração máxima no soro é de 8 a 10x maior que a concentração inibitória mínima. O pico de concentração sérica ocorre após 60 minutos da administração intravenosa (Ramirez et al, 2017).

A dose administrada é dependente de peso e fracionada em duas ou três aplicações diárias. A dosagem convencional é de 5mg/kg a cada 8 horas ou dose única de 15 mg/kg uma vez por dia . A amicacina exibe os efeitos tóxicos comuns aos aminoglicosídeos como nefrotoxicidade e ototoxicidade. A nefrotoxicidade é mais comum podendo chegar a 10% dos pacientes, no entanto é reversível quando a droga é descontinuada, este dano provocado é mais comum de ocorrer em pacientes com baixa filtração glomerular, pacientes diabéticos e desidratados. A ototoxicidade vestibular e auditiva ocorre de 4 a 6 % e é decorrente de doses elevadas, pode ser gerada a partir de radicais livres oxidativos, que danificam as células ciliadas, normalmente o dano é permanente (Bhimji SS et al, 2017).

A gentamicina um aminoglicosídeo utilizado no tratamento de diversas infecções bacterianas em especial causadas por microrganismo gram negativos. Assim como outros aminoglicosídeos não ocorre absorção intestinal sendo a mesma administrada via intravenosa, intramuscular, subconjuntival e subcapsular.

A duração normal do tratamento varia de sete a dez dias, podendo ser prolongado em casos de infecções graves. A dose indicada para administração em pacientes com função renal normal e infecções graves é de 3mg/kg/dia em duas doses a cada 12 horas ou três doses a cada

8 horas. Em caso de risco de vida pode-se administrar até 5 mg/kg/dia (Anvisa, 2013). Seu uso é limitado devido a seus efeitos gerados como nefrotoxicidade e ototoxicidade.

2.4.2 Polimixinas

As polimixinas foram isoladas pela primeira vez em 1947 do *Bacillus polymyxa*, que posteriormente foi classificado como *Paenibacillus polymyxa* em 1993 (Trimble et al, 2016). Foram introduzidos na clínica no final da década de 50; no entanto seu uso foi interrompido na década de 70 devido a seus potenciais tóxicos, sendo substituídas pelas cefalosporinas (Roberts et al, 2015).

As polimixinas não possuem atividade frente a microrganismos gram positivos e anaeróbios, contudo são efetivos frente a maioria de microrganismos gram negativos, incluindo membros da família *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella pneumoniae* (Trimble et al, 2016, Nikko et al, 2017).

São pequenas moléculas de lipopeptídeos cíclicos não ribossomais o qual possuem 1200 daltons de massa. O núcleo decapeptídico das polimixinas são compostos por um ciclo intramolecular de pentapeptídeos ligados a amida entre o grupo amina na cadeia lateral de resíduo de ácido diaminobutírico (Dab) na posição 4 e o grupo carboxil no resíduo de treonina C terminal (Roberts et al, 2015).

Atuam ligando-se ao lipopolissacarídeo e moléculas de fosfolipídeos presentes na membrana externa de bactérias gram negativas o qual é carregada negativamente. Essa ligação desloca íons Ca^{2+} e Mg^{2+} o qual atuam mantendo a estabilidade da membrana. A desestabilização da membrana leva a ruptura da mesma levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e consequentemente a morte celular (Trimble et al, 2016; Nikko et al, 2017).

A maioria dos mecanismos de resistência a polimixinas incluem alterações que reduzem a carga líquida negativa ou fluidez dos lipopolissacarídeos, aumento do efluxo das drogas e formação da cápsula. Na maioria das bactérias gram negativas os componentes PhoP / Q e PmrA / B regulam o sistema que são responsáveis pela resistência a polimixina, causando modificações químicas na estrutura do lipopolissacarídeo bacteriano. Esse sistema é responsável por alterar a carga catiônica da parede celular em resposta a baixos valores de

cálcio e magnésio além de baixo pH, excesso de Fe^{+3} e fagossomos. Todas essas modificações são responsáveis pela diminuição da afinidade da polimixina para superfície das células bacterianas (Trimble et al, 2016).

A polimixina B é utilizada na dose de 1,5 a 2,5 mg/kg/dia em pacientes com função renal normal. Em pacientes com deficiência na função renal, é administrado uma dose de 2,5 mg/kg no primeiro dia, as doses seguintes são corrigidas de acordo como a depuração de creatinina(ClCr). Entre 30 e 80 mL/min é administrado 1,0 a 1,5 mg/kg/d e com ClCr < 30 mL/min, administra-se 1,0 a 1,5 mg/kg a cada dois a três dias e em casos de pacientes anúricos a administração é de 1,0 mg/kg a cada cinco a sete dias (Eurofarma 2017). A nefrotoxicidade associada à polimixina é um fator limitante para seu uso na clínica, pois pode ocorrer em até 60% dos pacientes quando administrados via intravenosa (Roberts et al, 2015).

2.4.3 Glicilciclinas

Compondo uma nova classe de antimicrobianos as glicilciclinas tem como a tigeciclina sua primeira droga. É um derivado semissintético da minociclina e possui amplo espectro de ação frente a microrganismos gram positivos e gram negativos, além de anaeróbios (Pournaras et al, 2016).

A tigeciclina possui mecanismo de ação semelhante a as tetraciclinas, no entanto possuem a capacidade de se ligar cerca de 5 vezes mais forte que as tetraciclinas e dessa forma contornam algum mecanismos de resistência (Pereira Maia et al, 2010). Atuam ligando-se reversivelmente à subunidade 30S do ribossoma bacteriano e dessa forma dificulta a entrada do RNA transportador no local A do ribossoma, evitando o alongamento das cadeias peptídicas e interrompendo a síntese proteica.

A tigeciclina não apresenta absorção através do trato gastrointestinal, sendo administrada unicamente via intravenosa. A dosagem inicial indicada é de 100mg, posteriormente doses de 50 mg são aplicadas a cada 12 horas, em casos de pacientes com doenças renais a dose é reduzida a 25mg a cada dose inicial. A tigeciclina é eliminada por diferentes vias como via fecal (59%) e renal (33%) (Nguyen et al, 2013). De acordo com suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, apontam um baixo poder de penetração

nos órgãos mais internos do corpo, podendo levar a falhas terapêuticas devido à baixa concentração no sítio de infecção (Veleba et al, 2012).

2.5 Terpenos

Os terpenos são os principais componentes dos óleos essenciais e são produzidos por uma diversidade de espécie de plantas, as quais apresentam inúmeras funções como o mecanismo de defesa contra herbívoros e patógenos. O grande uso dos terpenos em saúde pode ser explicado por suas propriedades farmacocinéticas favoráveis como baixo peso molecular e lipofilidade (Vieira, 2018).

Todos os terpenos apresentam diferenças estruturais entre si, mas são essencialmente oriundas da geração de unidade 5C como o isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalila difosfato (DMAPP). Existem duas vias que podem gerar a unidade C5: a via do mevalonato e a via do fosfato de metileritritol (Viriato, 2014; Singh et al, 2015).

A via do mevalonato ocorre no citosol, retículo endoplasmático e peroxissomos. A condensação de acetil- CoA leva a síntese de 3-hidroxi-3 metilglutarilo-CoA que posteriormente produzirá ácido mevalônico. Através de processos de fosforilação e descarboxilação o ácido mevalônico é convertido em isopentenil difosfato (IPP) (Singh et al, 2015).

Quimicamente os terpenos podem ser chamados de “alcanos naturais” apresentando uma dupla ligação entre carbonos, sendo classificado como hidrocarbonetos insaturados (Murry, 2011). Quando o terpeno possui oxigênio é chamado de terpenóide os quais apresentam diversas funções químicas como: álcool, aldeído, éter, cetona e ácidos (Marei et al. 2012).

Os terpenos podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (C_5H_8) em: hemiterpeno (5C), monoterpeno (10C), sesquiterpeno (15C), diterpenos (20C), sesterpenos (25C), triterpeno (30C), tetraterpeno (40C) (Viriato, 2014, Singh et al, 2015). Também podem ser subclassificados em termos de grau de ciclização da molécula em: acíclicos (cadeia aberta), monocíclicos e bicíclicos (Dewick, 2015).

Os Mecanismos de ação de ação desses compostos podem ser: desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força motriz (FPM), transporte ativo, fluxo de elétrons e coagulação do conteúdo celular (Burt, 2004).

A perda da permeabilidade faz com que muitas atividades celulares sejam interrompidas como a produção de energia, transporte de membrana e outras funções metabólicas. A interrupção da membrana também pode interferir em processos de conversão de energia, processamentos de nutrientes e síntese de macromoléculas estruturais. Por passar pela membrana plasmática e parede celular, o que pode interromper o rearranjo dos ácidos graxos, moléculas de polissacarídeos e fosfatos. Todos esses elementos culminam na coagulação de componentes intracelulares (Swamy et al, 2016).

2.5.1 Linalol

O linalol é um metabólito secundário componente dos óleos essenciais de origem vegetal. É encontrado em uma diversidade de plantas como *Aniba rosaeodora* (Pau rosa), *Citrus reticulata* (tangerina), *Citrus bergamia* (bergamota), *Jasmin auriculatum* (jasmin), *Lavandula dentata* (lavanda), *Coriandrum sativum* (coentro) (Camargo et al, 2010).

O linalol (3,6 dimetyl- 1,6,octadien -3-ol) apresenta-se como um monoterpene alcoólico terciário de cadeia aberta e fórmula molecular de $C_{10}H_{18}O$ e peso molecular de 154,25g/mol, densidade de 0,87g/ml, apresenta ponto de ebulição a aproximadamente 199°C e solubilidade em água a 1,589 g/ml (Sigma, 2017).

É encontrado na forma de dois estereoisômeros 3R-(-)-Linalol e 3S-(+)-Linalol, o qual possuem dois odores diferentes assim como propriedades químicas e efeitos biológicos. Como monoterpene, o linalol apresenta importância nas indústrias alimentícia e cosmética, sendo utilizada como fixador de fragrâncias, onde aproximadamente 70% dos compostos contêm o linalol em sua formulação (Rosa et al, 2003; Bakkali et al, 2008).

Muitos efeitos já foram observados no linalol como: anticonvulsivante (Brum et al, 2001), hipotensão (Siqueira et al, 2004), sedação (Zu et al, 2013; Heldwen et al, 2014), anticancer (Chang et al, 2014), antinociceptivo (Peana et al, 2004), antileishmanial (Rosa, et al 2003; Batista et al, 2008) e antimicrobianos (Alviano et al, 2005 ; Yang et al, 2014).

2.5.2 Citral

O citral é um monoterpeno aldeído de cadeia aberta encontrado em óleos essenciais de várias plantas como: *Backhousia citriodora* (murta limão), *Ocimum basilicum* (manjerição), *Cymbopogon citratus* (capim limão), *Citrus sinensis* (laranjeira) (Shi et al., 2016; Gupta et al, 2017).

Também conhecido como lemonal, o citral (3,7 –dimetil- 2,6- octadienal) é um líquido oleoso que possui fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$, ponto de ebulição em 228 °C, densidade de 0,893g/cm³ e massa molar de 152.25g/mol.

Esse composto é uma mistura de dois isômeros geométricos insaturados e acíclicos, o neral (isômero cis) que confere o sabor de limão e o geranial (isômero trans) que confere o aroma cítrico (Leite et al, 2014; Miron et al, 2014).

O citral apresenta melhor ação em pH alcalino e pode ser utilizado em combinação com outros agentes apresentando ação sinérgica, apresenta atividade antitumoral, broncodilatadora e antimicrobiana (Souza et al, 2016).

2.5.3 Eucaliptol

O eucaliptol (1,8 cineol) é um monoterpeno éter cíclico, amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado em espécies de eucaliptos como o *Eucalyptus globulus* Labill e *Eucalyptus tereticornis* (Seol et al 2016). Possui fórmula molecular $C_{10}H_{18}O$ e massa molar de 154,249g/mol e densidade de 0,91g/mL (Sigma, 2017).

É amplamente utilizado em especial na indústria farmacêutica como analgésicos e antipiréticos para aliviar sintomas de gripes, resfriados e congestionamentos, além de demonstrar propriedades anti inflamatórias. Por atuar bloqueando a via da cicloxigenases, inibindo o TNF- α e o IL-1 β o eucaliptol controla a secreção de muco nas vias aéreas no tratamento de asma e sinusites (Souto et al, 2016; Lima et al, 2013).

2.6 Associações Farmacológicas

A interação entre drogas é importante a fim reduzir os efeitos indesejados, combater microrganismos resistentes aos antibióticos e evitar combinações potencialmente prejudiciais. O efeito sinérgico aumenta a eficácia do tratamento, assim como melhora a seletividade e reduz os efeitos colaterais, enquanto que reações antagônicas podem ser utilizadas para estudar o mecanismo de ação das drogas e tem sido de grande relevância na luta frente a patógenos resistentes aos antibióticos (Guimera et al, 2013).

A clínica médica é ciente dos benefícios das combinações de drogas. Substâncias isoladas que possuem apenas ação em apenas um alvo são geralmente menos eficazes no tratamento do que uma terapia combinada, a qual pode atuar em vários alvos simultaneamente e dessa forma potencializar o efeito desejado.

As interações são demonstradas graficamente a partir de isobogramas, os quais são construídos esboçando o valor das doses inibitórias dos agentes nos eixos x e y. Um sinergismo é observado quando a curva do isobograma se move em direção a linha côncava, quando uma linha convexa se forma um efeito antagônico (Biavatti, 2009).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de terpenos e antimicrobianos sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase e suas associações.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a susceptibilidade de cepas de *Klebsiella pneumoniae* a 9 antimicrobianos (Amoxicilina + ácido clavulânico; cefalexina; cefepime; cefoxitina; ceftriaxona; ertapenem; meropenem; netilmicina; imipenem)
- Avaliar fenotipicamente e genotipicamente a produção da carbapenemase;
- Determinar as Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e Concentrações bactericidas mínimas (CBM) do linalol, citral, eucaliptol, sulfato de amicacina, sulfato de gentamicina, sulfato de polimixina B e tigeciclina;
- Avaliar a interação entre o terpeno mais ativo e os antimicrobianos através da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

No presente estudo foram utilizados isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (n=9) de origens distintas (urina, sangue e aspirado traqueal). Duas cepas de referência do American Type Culture Collection (ATCC BAA 1705 e ATCC 700603) foram incluídas como controle positivo e negativo para produção de carbapenemase, respectivamente. Todas essas cepas são mantidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFMB) no Departamento de Antibióticos da UFPE. As cepas de *K. pneumoniae* foram catalogadas no laboratório como: LFBM 01, LFBM 02, LFBM 03, LFBM 04, LFBM 05, LFBM 06, LFBM 07, LFBM 08, LFBM 09.

4.2 Culturas, manutenção e padronização do inóculo

Culturas de *K. pneumoniae* foram estocadas após liofilização e mantidas em Ágar Mueller Hinton (AMH) (Himedia, Índia) sob óleo mineral. Para reativação as culturas foram transferidas para o caldo Mueller Hinton (Himedia, Índia) e incubadas a 35 ± 2 °C por 24h. Após incubação, as culturas foram semeadas em placas de Petri contendo AMH e incubadas sob as mesmas condições. Em seguida foram transferidas quatro colônias com cerca de 4 mm para um tubo de ensaio contendo 5mL de caldo Mueller Hinton. A suspensão foi homogeneizada até obter uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland, o que corresponde a 10^8 UFC/mL.

4.3 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Klebsiella pneumoniae* foi determinada numa primeira etapa através do método de difusão em meio sólido preconizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). Para este teste, ágar Mueller Hinton foi dispensado em placa de Petri de 90 mm a fim de obter uma camada de quatro mm. Em

seguida, um inóculo padronizado em 10^5 UFC /mL foi semeado em toda extensão da placa com auxílio de um swab. Os discos padronizados com uma quantidade conhecida do agente antimicrobiano foram colocados na superfície do ágar Mueller Hinton, quatro discos por placa. Após 24h de incubação a 35° C o diâmetro dos halos em torno dos discos foram medidos com auxílio de um paquímetro digital e esses expressos em milímetros.

Discos padronizados com drogas (OXOID) foram utilizados para este ensaio, a saber: amoxicilina + ácido clavulânico - AMC (10 µg), cefalexina - CFX (30 µg), cefepime - CPM (30 µg), cefoxitina - CPO (30 µg), ceftriaxona - CRO (30 µg), ertapenem - ERT (10 µg), meropenem- MER (10 µg), imipenem - IMI (10 µg), netilmicina - NET (15) µg.

Os valores foram interpretados de acordo com o CLSI, 2017 em sensível, intermediário e resistente conforme a tabela 1.

Tabela 1- Padrões interpretativos de diâmetros de halos de inibição (milímetros) para os antibióticos frente a membros da família *Enterobacteriaceae* de acordo com Clinical Laboratory Standards Institute (M100S) (CLSI,2017)

Antimicrobianos	Sensível	Intermediário	Resistente
Amoxicicilina+ ácido clavulânico	≥ 18	14-17	≤ 13
Cefalexina	≥ 18	15-17	≤ 14
Cefepime	≥ 25	24-18	≤ 18
Cefoxitina	≥ 18	15-17	≤ 14
Ceftriaxona	≥ 23	22 ≥ 23	≤ 19
Ertapenem	> 22	19-21	≤ 18
Meropenem	> 23	20-22	≤ 19
Imipenem	≥ 23	20-22	≤ 19
Netilmicina	≥ 15	13-14	≤ 12

4.4 Determinação fenotípica da presença da enzima carbapenemase - Teste de Hodge Modificado

A presença da carbapenemase biossintetizada pelas cepas de *Klebsiella pneumoniae* foi realizada através do Teste de Hodge modificado de acordo com o compêndio oficial

publicado pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017). *Escherichia coli* ATCC 25922 foi padronizada a 10^8 UFC/mL e semeada com auxílio de swab em toda extensão da placa de Petri contendo, Ágar Mueller Hinton e um disco de imipenem de 10 µg foi colocado ao centro da placa. Em seguida *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, controles positivo e negativo para produção da carbapenemase respectivamente, foram semeadas em estrias com alças descartáveis calibradas em 1µL sobre a *Escherichia coli*. Cada amostra teste das cepas *K. pneumoniae* foram igualmente semeadas de forma a obter um crescimento em cruz. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 18h. O teste foi considerado positivo após observação de uma distorção em torno do halo de inibição, indicando a produção da carbapenemase.

4.5 Determinação genotípica da produção da carbapenemase - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A extração e quantificação do DNA das cepas de *K. pneumoniae* foi realizada utilizando um kit de extração de DNA Brazol (LGC Biotechnology) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A sua medição foi realizada através de espectrofotometria (Ultraspec 3000; Pharmacia Biotech) num intervalo de onda de 260-280nm.

O gene *bla_{KPC}* foi investigado por PCR utilizando os primers (KPC-1a 5'-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3', KPC-1b 5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3'). As reações de amplificação foram preparadas em um volume inicial de 25 µL por tubo, sendo utilizado 5ng do DNA genômico, 10 pmol dos primers, tampão de reação 1x (concentração final), dNTP 200 µM (Ludwig Biotec), MgCl₂ 1,5 mM e 2,0 U Taq DNA polimerase (Promega) (Yigit et al., 2001).

A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador (Biosystems®) da seguinte forma: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 min, anelamento a 64 °C durante 1 min e extensão a 72 °C durante 1 min e então uma extensão final de 10 min a 72 °C (Jacome et al., 2016). Nesse experimento foram incluídos cepas de referência, um controle negativo (*K. pneumoniae* ATCC 700603) e um controle positivo (*K. pneumoniae* ATCC BAA 1705) para o gene *bla_{KPC}* ambas mantidas no

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Os produtos da PCR foram corados com o corante blue-green (Jena Bioscience) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0 % em tampão TBE (Tris-borato 0,089 M, EDTA 0,002M) sob uma tensão constante de 100V. As bandas dos produtos gerados na PCR foram visualizadas sob luz UV e documentadas fotograficamente.

Enterobacterial repetitive intergenic consensus - ERIC-PCR

Para tipagem molecular das cepas de *Klebsiella pneumoniae* foi utilizado o método a ERIC-PCR. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase, 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 1,5 mM de $MgCl_2$ tampão de reação (concentração final 1x) e 10 pmol dos primers (ERIC-1 [5'- ATG TAAGCTCCTGGGGATTAC-3'], ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']). A amplificação utilizada na ERIC-PCR foi realizada em um termociclador (Biosystems®) da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 36°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 8 minutos. Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72°C.

Os produtos da ERIC- PCR foram corados com blue-green e submetidos à eletroforese a 1,5% em gel de agarose. Os padrões de banda gerados foram analisados e o software PAST foi utilizado para gerar um dendograma (Duan et al., 2009).

4.6 Terpenos e antimicrobianos convencionais

Os terpenos: linalol (97%), citral ($\geq 95\%$) e eucaliptol ($\geq 99\%$) foram obtidos da Sigma Aldrich- Brasil e os antimicrobianos dos seguintes laboratórios farmacêuticos a saber: Sulfato de amicacina (Ariston), sulfato de gentamicina (Santisa), sulfato de polimixina B (Eurofarma) e tigeciclina (Wyeth).

Os antimicrobianos foram solubilizados em água destilada e esterilizada enquanto que os terpenos foram solubilizados em um sistema composto por Tween 80/ etanol/ água na

proporção (1:3:6). Todas as soluções estoques foram esterilizadas por filtração utilizando membrana Milipore® de 0,22µm de porosidade e 150 µm de espessura.

A resistência foi definida para cada antimicrobiano de acordo com os critérios estabelecidos pelo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2016) para amicacina (CIM ≥ 64 µg/mL) e gentamicina (CIM ≥ 16 µg/mL). Para polimixina B e tigeciclina (CIM ≥ 4 µg/mL) preconizado pela Anvisa (NOTA TÉCNICA Nº 01/2013).

4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços preconizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute com algumas modificações (CLSI, 2017).

Diluições seriadas foram realizadas a partir de 100µL da solução estoque de cada antimicrobiano, o qual foi dispensado na primeira linha (A) até a última linha (H) de forma a obter concentrações finais que variaram de 512 a 4µg/mL para linalol e sulfato de gentamicina, 1280 a 10 µg/mL para o citral, eucaliptol e sulfato de amicacina e 64 a 0,5 µg/mL para sulfato de polimixina B e tigeciclina.

Posteriormente as culturas de *Klebsiella pneumoniae* (100µL) foram dispensadas em todos os poços da microplaca de forma a obter ao final uma concentração de 10^4 UFC/poço. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. O sistema Tween 80/etanol/água foi incluído no experimento para assegurar que não alteram a viabilidade dos micro-organismos. Em seguida 20 µL de resazurina numa concentração a 0,02% foram adicionadas em todas as placas e reincubadas a 35 ± 2 °C por 3h.

A Concentração Bactericida Mínima foi determinada a partir dos poços onde não foi observado crescimento. Alíquotas com 10µL foram semeadas em ágar Mueller Hinton seguida de incubação a 35 ± 2 °C por 24h. Após incubação foram enumeradas as unidades formadoras de colônias. A CBM foi definida como a menor concentração dos agentes antimicrobianos e terpenos capaz de inviabilizar 99,99% da população bacteriana inicial (Courvalin, 1985). Para a terceira parte deste trabalho, o linalol foi escolhido com base nos valores da CIM.

4.8 Determinação da Concentração inibitória fracionada (Ensaio de *Checkerboard*)

Com base nos valores obtidos da CIM, foram preparadas soluções dos agentes antimicrobianos em concentrações sub inibitórias as quais variaram de 1/2 a 1/256 da CIM e de 1/2 a 1/4096 da CIM para o linalol e antimicrobianos respectivamente. De cada uma das diluições desses agentes antimicrobianos foram depositados 50 µL na microplaca. O agente antimicrobiano na orientação vertical (1 a 12) e o linalol na orientação horizontal (A a H). Em seguida, 100 µL da suspensão bacteriana padronizada em 10^6 UFC/mL foram dispensados em todos os poços da microplaca (Lorian, 2005).

Os critérios de interpretação para a associação entre os antimicrobianos e o linalol foram obtidos a partir do cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (CIF índice) de acordo com a equação: $(\text{CIM do antimicrobiano associado ao linalol} / \text{CIM do antimicrobiano}) + (\text{CIM do linalol associado ao antimicrobiano} / \text{CIM do linalol})$. Os valores de $\text{ICIF} \leq 0,5$ foram interpretados como sinergismo total, $\text{CIFI} > 0,5$ mas ≤ 4 como indiferentes. O efeito foi antagônico quando >4 (Lee et al, 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Susceptibilidade aos antimicrobianos

Os perfis de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *K.pneumoniae* estão apresentados na tabela 2. Os resultados mostraram que os isolados expressaram resistência as cefalosporinas, sendo 100% a ceftriaxona e cefalexina e 90,9% a cefepime e cefoxetina. Também mostraram resistência de 100% a penicilina (Amoxicilina+ Acido Clavulanico) e ao grupo dos aminoglicosídeos apresentaram resistência de 81,8% a netilmicina. Dos carbapenêmicos avaliados o imipenem foi o que apresentou susceptibilidade (45,5%), contudo todas as cepas foram resistentes ao ertapenem (100%).

Tabela 2- Resultado do tamanho dos halos de inibição (milímetros) para cepas de *Klebsiella pneumoniae* e porcentagem de resistência a cada antimicrobiano.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMC (10 µg)	CFX (30µg)	CPM (30 µg)	CPO (30µg),	CRO (30µg)	ERT (10 µg)	MER (10µg)	IMP (10µ)	NET (15µ)
ATCC BAA 1705	0	0	10	8	8	0	19	19	6
ATCC 70003	0	14	20	10	16	0	30	31	20
LFBM 01	0	0	9	7	9	0	16	19	7
LFBM 02	0	0	0	0	0	0	0	0	5
LFBM 03	0	0	0	5	3	0	20	23	8
LFBM 04	0	0	0	12	10	0	21	23	10
LFBM 05	0	0	12	17	12	0	19	21	7
LFBM 06	0	0	0	9	0	0	21	23	11
LFBM 07	0	0	0	5	0	0	22	22	5
LFBM 08	0	0	5	6	10	0	6	7	14
LFBM 09	0	0	0	10	0	0	19	19	5
Critério de resistência (halo em mm)	≤13	≤14	≤18	≤14	≤19	≤18	≤19	≤19	≤12
Resistência ao antimicrobiano (%)	100%	100%	90,9%	90,9%	100%	100%	54,5%	45,4%	81,8%

LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos; AMC: Amoxicilina+ ácido Clavulânico; CFX: Cefalexina; CPM: Cefepime; CPO: Cefoxitina; CRO: Ceftriaxona; ERT: ertapenem; MER: meropenem; NET: netilmicina; IMP: imipenem; mm: milímetros

Deteção fenotípica e genotípica da produção da carbapenemase - Teste de Hodge modificado e Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Um fenótipo positivo para a produção da carbapenemase foi observado através do teste de Hodge modificado para todas as cepas de *Klebsiella pneumoniae*. A confirmação da produção da enzima carbapenemase foi obtida através da detecção do gene *bla_{KPC}* por PCR.

A genotipagem pela técnica da ERIC-PCR mostrou 9 perfis genéticos distintos, com variado grau de similaridade entre os isolados, de 32% a 100%. Os isolados LFBM 03, LFBM 04 e LFBM 05 mostraram 100 % de similaridade genética. A figura 19 apresenta o dendograma dos perfis genéticos.

A tabela 3 mostra a origem dos isolados, assim como o perfil de resistência aos antimicrobianos pelo método de difusão em meio sólido, o resultado do teste de Hodge modificado e a PCR das cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

A Cepa LFBM 07 apresentou resistência ao carbapenêmico ertapenem e resistência intermediária ao meropenem e imipenem e possuiu o teste de Hodge positivo, contudo foi negativa para gene *bla_{KPC}* através da PCR (tabela 3). Todas as cepas demonstraram perfis de resistência diversos, no entanto, levando-se em consideração os carbapenêmicos, todas as cepas foram resistentes, no entanto, essa resistência variou quando foi utilizado o meropenem e o imipenem. Todavia, todos foram positivos para expressão do *bla_{KPC}*.

A aquisição de genes que codificam as carbapenemasas nem sempre estão associadas a altos níveis de resistência aos carbapenêmicos (Poirel et al, 2007). Essa resistência é variável pode ser explicada por fatores como: coexistência de outros mecanismos de resistência ou supressão genética que leva silenciamento do gene (Livermore et al, 2002; Aktas et al, 2006).

Tabela 3- Origem, perfil de susceptibilidade e detecção fenotípica e genotípica para o gene *bla_{KPC}* por PCR.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Origem	Resistência	THM	PCR para <i>bla_{KPC}</i>
ATCC BAA 1705	Urina	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER; NET; IMP	+	+
ATCC 70003	Urina	AMC; CFX; CPO; CRO; ERT	+	-
LFBM 01	Urina	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER; NET; IMP	+	+
LFBM 02	Urina	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER; NET; IMP	+	+
LFBM 03	Aspirado traqueal	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER* NET	+	+
LFBM 04	Urina	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER* NET	+	+
LFBM 05	Urina	AMC; CFX; CPM; CPO*; CRO; ERT; IMP* NET	+	+
LFBM 06	Urina	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; NET	+	+
LFBM 07	Sangue	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER *, IMP* NET	+	-
LFBM 08	Aspirado traqueal	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER; IMP; NET*	+	+
LFBM 09	Urina	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER; IMP* NET	+	+

LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos; THM: Teste de Hodge modificado; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; AMC: Amoxicilina+ Acido Clavulanico; CFX: Cefalexina; CPM: Cefepime; CPO: Cefoxitina; CRO: Ceftriaxona; ERT: ertapenem; MER: meropenem; NET: netilmicina; IMP:imipenem *Resistencia Intermediária

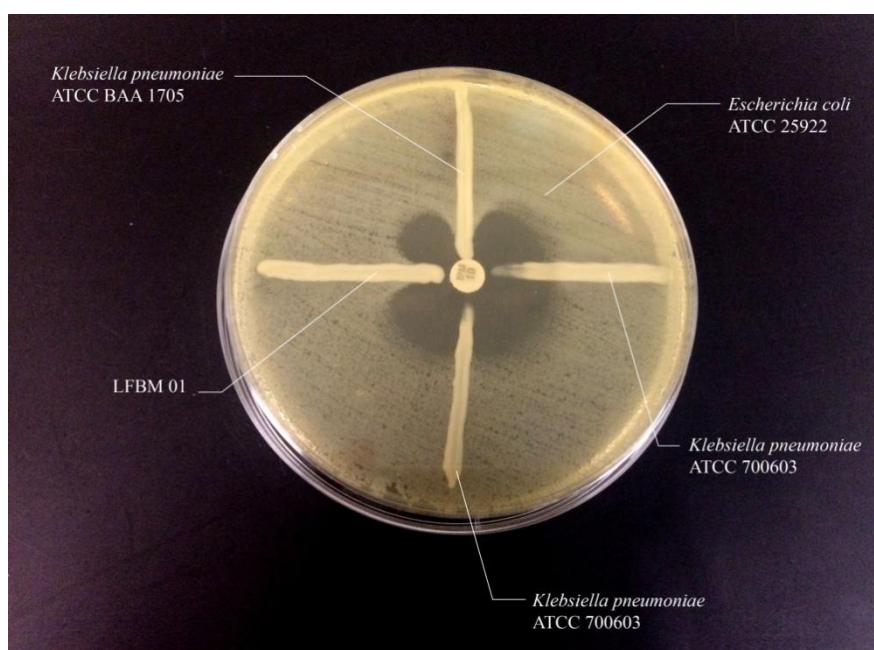


Figura 1: Teste de Hodge modificado para todas as cepas de *Klebsiella pneumoniae* – foto da autora.

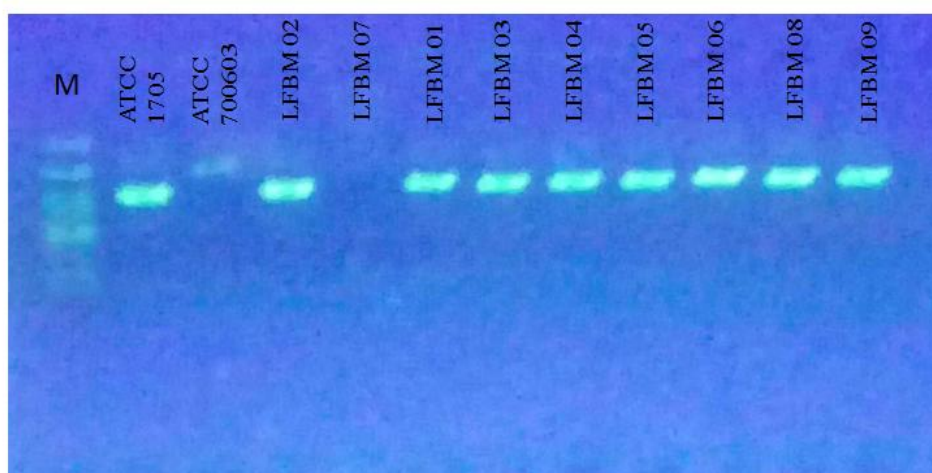


Figura 2 : Gel de agarose 1,5% corado com blue-green do gene *bla*_{KPC} amplificado por PCR. M: marcador de peso molecular (100pb). Bandas 1 e 2 : *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (controle positivo e negativo para o gene *bla*_{KPC}, respectivamente), bandas 3 a 11: cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

A ERIC-PCR revelou que 3 isolados possuem relação clonal (LFBM 03, LFBM04 e LFBM 05) mesmo sendo de origens distintas e possuem diferentes fenótipos de resistência antimicrobiana. Os relatos da literatura corroboram com esses resultados, o mesmo foi observado por Ben Hamouda et al (2003) e Cabral et al (2012) onde isolados idênticos na ERIC-PCR apresentaram perfis de susceptibilidade diferentes.

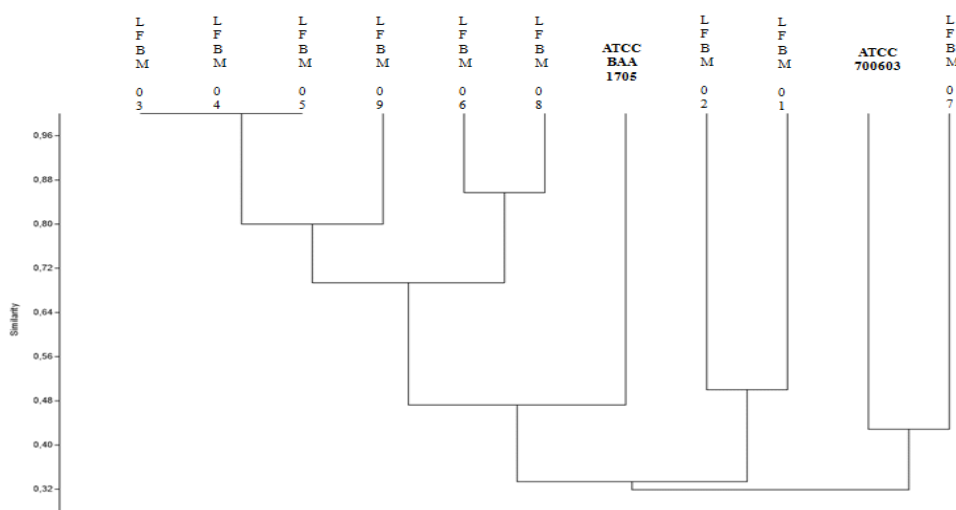


Figura 3: Dendrograma gerado através do software PAST 2.15, mostrando a similaridade genética para as cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Atividade antimicrobiana

A tabela 4 apresenta os valores da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima (CIM/ CBM) dos terpenos e agentes antimicrobianos sobre as cepas de *Klebsiella pneumoniae* assim como a origem do isolamento e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos avaliados pelo teste de difusão em meio sólido.

Das cepas de *Klebsiella pneumoniae* estudadas, todas revelaram um perfil de resistência frente a amicacina, gentamicina, polimixina B e tigeciclina. No entanto, baseado nos critérios descritos pelo CLSI (2016), as cepas LFBM 08 e ATCC 700603 mostraram-se sensíveis a amicacina cuja CIM $\leq 10 \mu\text{g/mL}$.

Os valores da CIM para linalol foram iguais a $512 \mu\text{g/mL}$ para todas as cepas. No entanto, não foi possível determinar a CIM para o citral e eucaliptol pois as cepas de *Klebsiella pneumoniae* apresentaram valores superiores a $1280 \mu\text{g/mL}$. Quando esses valores foram comparados entre si, diferenças estatisticamente significantes foram encontradas, $p \geq 0,5$.

Desta forma e levando em consideração a publicação de Sartoratto et al (2004) o qual definiu uma CIM entre $50- 500 \mu\text{g/mL}$, apresenta forte atividade antimicrobiana, entre $600 - 1500 \mu\text{g/mL}$ uma ação moderada e uma CIM $>1500 \mu\text{g/mL}$ possui uma fraca atividade o linalol mostrou uma forte atividade antimicrobiana comparados ao citral e eucaliptol e dessa forma foi selecionado para o ensaio de *checkboard*.

De acordo com Burt, 2004; Moussaqui et al 2016 a atividade antimicrobiana do linalol observada para o esta relacionada principalmente a sua capacidade em desestruturar a membrana citoplasmática dos microrganismos e dessa forma alterar a permeabilidade, permitindo o extravasamento de componentes presentes no interior do citoplasma. A destruição da membrana resulta na liberação de lipopolissacarídeos, que aumentam a permeabilidade. Essa desestruturação influencia diretamente o metabolismo energético, concentração de ATP intracelular diminuída pelo seu extravasamento. Esse efeito antimicrobiano também pode está relacionado a redução do potencial de membrana, a depleção de ATP e ruptura da bomba de prótons que intensificam a permeabilidade da membrana. Todos esses eventos podem levar a coagulação de componentes celulares internos do citoplasma e a quebra de ligações entre as camadas de lipídeos e proteínas (Swamy et al, 2016; Saad et al, 2013). Dessa forma facilitando a ação de outras drogas, como os antimicrobianos avaliados neste estudo.

Pellegrini et al (2018) avaliou a ação antimicrobiana de óleos essenciais incluindo *Coriandrum sativum* (coentro) o qual mostrou o linalol como o principal constituinte (77%). Esse óleo rico em linalol demonstrou atividade antimicrobiana frente a microrganismos como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, acredita-se que esse efeito antimicrobiano do óleo tenha sido proporcionado pela capacidade de permeabilizar a membrana no microrganismo, gerando perda dos constituintes celulares e interrupção do metabolismo celular.

Di Sotto et al (2011) através do teste *in vitro* de micronúcleos de linfócitos humanos periféricos, descreveram que o linalol não apresenta genotoxicidade, em concentrações que variam de 0,5 a 100 µg/mL. Em outro ensaio de genotoxicidade realizado pelo teste de Ames, esses autores demonstraram que o linalol não apresenta efeito mutagênico.

A resistência à tigeciclina encontra-se em conformidade com a literatura. Os mecanismos de resistência a tigeciclina são complexos, no entanto acredita-se que um dos mecanismos relacionados a essa resistência são as bombas de efluxo (Pournaras et al, 2016; Zheng et al, 2014). Contudo outros mecanismos desempenham um papel importante na resistência de *K. pneumoniae* como a presença do gene *RamA*, responsável por regular a bomba de efluxo. Foi observado que uma CIM > 2 µg/mL para tigeciclina estava associada a níveis aumentados desse gene (Ruzin et al, 2008; Rosenblum et al, 2011; Veleba et al, 2012).

Neste trabalho os valores de CIM para os aminoglicosídeos amicacina e gentamicina apresentam-se elevados quando comparados a Tang et al (2016) com cim entre 1 e 128 µg/mL para amicacina e 0,5 a >128 para gentamicina. Contudo, existem enzimas que agem modificando a estrutura química do antibiótico e dessa forma impedem que se liguem ao alvo, são chamadas de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que quando presente são capazes de elevar a CIM em mais de 10x (Durante- Magoni et al, 2009).

Os valores da polimixina B estão de acordo com a literatura. Eleman (2010) obteve uma CIM que variou de 16 a 128 µg/mL para isolados de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase. O aumento de cepas resistentes a polimixina é preocupante, essa resistência pode ocorrer através de modificações químicas na estrutura do lipopolissacarídeo bacteriano (Jacobs et al, 2017). A resistência pode ainda alterar a carga catiônica da parede celular em resposta a baixos valores de peptídeos antimicrobianos, magnésio, cálcio e baixo pH e altas concentrações de ferro e zinco. Essas modificações reduzem a carga negativa da membrana externa da bactéria, resultando desta forma na redução da afinidade da polimixina para superfície das células bacterianas (Jeannot et al, 2017; Trimble et al, 2016).

Tabela 4- Concentração inibitória mínima e bactericida mínima de terpenos e antimicrobianos convencionais sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae	Origem	CIM/CBM (µg/MI)							
		AMI	GENT	POL	TIG	LIN	CIT	EUC	Resistente*
ATCC BAA 1705	Urina	640/>1280	64/64	16/16	16/32	512/>512	>1280/>1280	>1280/>1280	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER; NET;IMP
ATCC 700603	Urina	10/<10	32/32	16/16	16/16	512/>512	>1280/>1280	>1280/>1280	AMC; CFX; CPO; CRO; ERT
LFBM 01	Urina	320/640	64/64	8/16	16/16	512/>512	>1280/>1280	>1280/>1280	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER; NET;IMP
LFBM 02	Urina	80/640	64/>512	64/>64	64/>64	512/>512	>1280/>1280	>1280/>1280	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER; NET;IMP
LFBM 03	Aspirado Traqueal	160/1280	64/>512	4/8	16/32	512/>512	>1280/>1280	>1280/>1280	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; NET
LFBM 04	Urina	320/1280	64/64	4/16	16/32	512/>512	>1280/>1280	>1280/>1280	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; NET
LFBM 05	Urina	320/320	32/32	64/>64	16/64	512/>512	>1280/>1280	>1280/>1280	AMC; CFX; CPM; CRO; ERT; MER; NET
LFBM 06	Urina	80/1280	16/16	64/>64	16/32	512/>512	>1280/>1280	>1280/>1280	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; NET
LFBM 07	Sangue	160/1280	512/>512	4/16	16/32	512/>512	>1280/>1280	>1280/>1280	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; NET
LFBM 08	Aspirado Traqueal	<10/<10	256/256	8/8	16/32	512/512	>1280/>1280	>1280/>1280	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER; IMP
LFBM 09	Urina	80/320	64/512	8/16	16/32	512/>512	>1280/>1280	>1280/>1280	AMC; CFX; CPM; CPO; CRO; ERT; MER; NET

LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos; CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; POL: polimixina B; TIG: tigeciclina; LIN: linalol; CIT: citral; EUC: eucaliptol; AMC: Amoxicilina+ Acido Clavulanico; CFX: Cefalexina; CPM: Cefepime; CPO: Cefoxitina; CRO: Ceftriaxona; ERT: ertapenem; MER: meropenem; NET: netilmicina; IMP:imipenem *Determinado pelo teste de Disco difusão

Ensaio de Tabuleiro de xadrez – *Checkerboard*

Os resultados CIM, CIF individual, CIF índice assim como o percentual de redução da CIM do linalol, sulfato de amicacina, sulfato de gentamicina, polimixina B e tigeciclina sobre as cepas de *Klebsiella pneumoniae* (LFBM 01, LFBM 02, LFBM 03, LFBM 04, LFBM 05 e ATCC BAA 1705) são apresentadas na tabela 5, seguidos dos isobologramas. As cepas foram selecionadas por apresentarem perfis de resistência mais altos aos antimicrobianos quando comparadas as outras.

Um efeito sinérgico foi observado para todas as associações do linalol com os antimicrobianos e isso foi confirmado pelos valores de ICIF que variaram de 0,16 – 0,31 e reduções percentuais dos valores da concentração inibitória mínima iguais ou superiores a 75%.

As concentrações sub inibitórias mínimas do linalol (256 µg / mL) aumentou a atividade antimicrobiana de todos os agentes antimicrobianos.

A associação linalol-tigeciclina apresentou CIF mais baixo, cujos valores variaram de 0,16 a 0,19 sendo considerada a associação mais ativa. A CIM da tigeciclina (CIM individual de 64 µg / mL) foi reduzida para 2 µg / mL (1/32x CIM). Essa combinação foi mais efetiva para a cepa LFBM 02 (CIFI= 0,16), cuja tigeciclina reduziu de 64 µg / mL para 2 µg / mL (1/32 x CIM) e redução percentual da CIM de 96,8%. O linalol reduziu de 512 µg / mL para 64 (1/8 x CIM) e redução percentual da CIM de 87,5%.

Todos os antimicrobianos foram mais eficientes em reduzir a CIM do linalol quando em associação cuja CIM= 512 µg / mL foi reduzida para 32 µg / mL ou 64 µg / mL, uma redução de 1/16 ou 1/8x CIM.

A associação amicacina/linalol foi mais eficaz sobre a cepa de *K. pneumonie* LFBM 04. Nesta associação a CIM da amicacina (CIM=320 µg / mL) foi reduzida para 40 µg/mL quando combinada com 32 µg / mL do linalol ou seja 1/8 x CIM desse monoterpeno. O efeito sinérgico da associação amicacina /linalol sobre a cepa LFBM 04 foi observado também pelo baixo valor do CIFI, que foi igual a 0,19 e por uma redução da CIM de 87,5 % / 93,75 para amicacina e linalol respectivamente.

Um sinergismo foi observado com a associação getamicina/linalol cujo ICIF variou de 0,19 a 0,25. As cepas de *K. pneumonie* LFBM 01 e LFBM 05 mostraram-se as mais

sensíveis a esta associação, cujo valor da CIM da gentamicina foram reduzidos de 64 µg/mL para 8 µg/mL e 32 µg/mL para 4 µg / mL respectivamente.

A atividade da polimixina B foi aumentada quando associada ao linalol numa concentração igual a 32µg/ml. As maiores reduções dos valores da CIM foram observadas para as cepas LFBM 04 e ATCC BAA 1705 e essas reduções foram iguais a 1/8 da CIM inicial da polimixina.

O linalol é um terpeno comumente encontrado em óleos essenciais de diversas plantas aromáticas e assim como outros terpenos podem aumentar a permeabilidade de algumas drogas, desempenhando papel importante do ponto de vista farmacológico. Essa hipótese pode ser sustentada, pois de acordo com Burt 2004 e Vieira, 2018 os fitocompostos agem sinergicamente entre eles protegendo a planta de patologias fungicas, bacterianas e virais bem como evitando o ataque de herbívoros.

A associação de drogas com o objetivo de obter um efeito sinérgico é essencial na clínica, pois poderá aumentar a eficácia terapêutica assim como o espectro de ação dos antimicrobianos, dessa forma diminuindo o tempo de duração da terapia (Khan et al. 2012).

De acordo com Wagner et al, 2009 um fitocomposto associado a um fármaco tem a capacidade de modificar a atividade metabólica dos microrganismos através da reversão ou modulação da resistência ou através de novos mecanismos de ação. Esse efeito sinérgico pode ser obtido quando os antimicrobianos combinados afetam vários alvos, como por exemplo: enzimas, proteínas, canais iônicos, DNA/RNA e ribossomos. Devido a sua lipofilidade os terpenos possuem uma grande afinidade por membranas celulares, permeando a membrana das bactérias. Os fitocompostos ainda podem interferir com os mecanismos de resistência das bactérias, dessa forma são capazes de suprimir completamente os mecanismos de resistência.

Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenamase é considerada um patógeno causador de diversas infecções humanas, em especial infecções nosocomiais. São frequentemente isolados no ambiente hospitalar, gerando infecções graves principalmente em pacientes imunocomprometidos, onde o tratamento deve ser rapidamente eficaz (Wentao et al, 2017). Estão associados a pneumonias, abscessos hepáticos, infecções do trato urinário e septicemias (Wang, 2018).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) através da Lista Prioritária de Patógenos (2017), as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos ocupam o 3º lugar em

estado crítico de microrganismos patogênicos para os quais há uma urgência de novos fármacos e esquemas terapêuticos. Estando classificados também em estado crítico *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de carbapenemase em 1º e 2º lugar, respectivamente.

A terapia para o tratamento de infecções provocadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase é limitada ao uso de polimixinas (B ou E) em associação tigeciclina ou com aminoglicosídeos como amicacina e gentamicina (Anvisa, 2013; Lee et al, 2016). A administração de uma terapia combinada pode aumentar a atividade do antimicrobiano e suprimir ou retardar o surgimento da resistência (Jacobs et al, 2017).

A monoterapia com essas drogas devem ser evitadas, uma vez que as taxas de mortalidade para pacientes tratados com monoterapias são maiores quando comparados a pacientes tratados com terapia combinada (Wentao et al, 2017).

A falta de opções terapêuticas, assim como o uso irracional de antibióticos na prática clínica, resulta em estadias prolongadas nos hospitais e contribuem dessa forma para altas taxas de mortalidade (Ye et al, 2018). Infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase estão associadas com alta mortalidade (25-75%) (Karaïskos et al, 2017).

Tabela 5: Associação entre linalol e antimicrobianos sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase

<i>Klebsiella pneumoniae</i> Produtora de carbapenemase	Associação	Individual CIM (µg/mL)	CIM Associação (µg/mL)	CIF Individual	CIF Index (CIFI)	Interpretação	Redução CIM %
LFBM 01	LIN/ AMI	512/320	64/40	0,125/0,125	0,25	Sinérgica	87,5/87,5
	LIN/GEN	512/64	32/8	0,063/0,125	0,19	Sinérgica	93,75/87,5
	LIN/POL B	512/8	32/2	0,063/0,25	0,31	Sinérgica	93,75/75,0
	LIN/TIG	512/16	32/2	0,063/0,125	0,19	Sinérgica	93,75/87,5
LFBM 02	LIN/ AMI	512/80	64/10	0,125/0,125	0,25	Sinérgica	87,5/87,5
	LIN/GEN	512/64	64/8	0,125/0,125	0,25	Sinérgica	87,5/87,5
	LIN/POL B	512/64	64/8	0,125/0,125	0,25	Sinérgica	87,5/87,5
	LIN/TIG	512/64	64/2	0,125/0,031	0,16	Sinérgica	87,5/96,8
LFBM 03	LIN/ AMI	512/160	32/40	0,063/0,25	0,31	Sinérgica	93,75/75,0
	LIN/GEN	512/64	64/8	0,125/0,125	0,25	Sinérgica	87,5/87,5
	LIN/POL B	512/4	64/0,5	0,125/0,125	0,25	Sinérgica	87,5/87,5
	LIN/TIG	512/16	32/2	0,063/0,125	0,19	Sinérgica	93,75/87,5
LFBM 04	LIN/ AMI	512/320	32/40	0,063/0,125	0,19	Sinérgica	93,75/87,5
	LIN/GEN	512/64	64/8	0,125/0,125	0,25	Sinérgica	87,5/87,5
	LIN/POL B	512/4	32/0,5	0,063/0,125	0,19	Sinérgica	93,75/87,5
	LIN/TIG	512/16	32/2	0,063/0,125	0,19	Sinérgica	93,75/87,5
LFBM 05	LIN/ AMI	512/320	64/40	0,125/0,125	0,25	Sinérgica	87,5/87,5
	LIN/GEN	512/32	32/4	0,063/0,125	0,19	Sinérgica	93,75/87,5
	LIN/POL B	512/64	64/8	0,125/0,125	0,25	Sinérgica	87,5/87,5
	LIN/TIG	512/16	32/2	0,063/0,125	0,19	Sinérgica	93,75/87,5
ATCC BAA 1705	LIN/ AMI	512/640	64/80	0,125/0,125	0,25	Sinérgica	87,5/87,5
	LIN/GEN	512/64	64/8	0,125/0,125	0,25	Sinérgica	87,5/87,5
	LIN/POL B	512/16	32/2	0,063/0,125	0,19	Sinérgica	93,75/87,5
	LIN/TIG	512/16	32/2	0,063/0,125	0,19	Sinérgica	93,75/87,5

LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos; CIM: Concentração inibitória mínima; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; POL B: polimixina B; TIG: tigeciclina, LIN: linalol; CIFI: Índice de Concentração inibitória fracionada; Redução da CIM= (CIMdroga+CIMcombinada)x100/ CIMdroga.

6 CONCLUSÃO

Todas as cepas foram positivas para o teste de Hodge modificado, possuindo o fenótipo para produção da carbapenemase.

O teste genotípico para detecção do gene *bla_{KPC}* confirmou a produção em todas as cepas testes, exceto a cepa LFBM 07 e a ERIC –PCR demonstrou que três cepas são clones, no entanto possuem origem e perfil de resistência diferente.

Ao determinar as concentrações inibitórias dos terpenos foi observado que o linalol apresentou a melhor atividade frente às cepas de *K.pneumoniae* carbapenemase positiva do que o citral e o eucaliptol. As cepas demonstraram resistência aos antimicrobianos testados.

Quando avaliado as associações entre o linalol e os antimicrobianos, todas as interações foram consideradas sinérgicas, com CIFI menor que 0,5.

A interação com melhores índices de redução da CIM foi observada na combinação linalol-tigeciclina.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, Jaime Antonio. Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenamases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 49, n. 3, p. 240-4, 2017.
- ALVIANO, W. S. et al. Antimicrobial activity of Croton cajucara Benth Linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 20, n. 2, p. 101-105, 2005.
- AMBLER, R. P. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 289:321–331
- ANVISA. Nota Técnica 01/2013. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes. Série. 2013.
- ANVISA. Modulo 5- Teste de sensibilidade aos antimicrobianos. 2017. Disponível em : http://www.anvisa.gov.br/servicosau/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/gram_negativos8.htm
- BAKKALI, Fadil et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BATISTA, P. A. et al. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-Linalool in mice. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 440, n. 3, p. 299-303, 2008
- BEN-HAMOUA, Thouraya et al. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. **Journal of medical microbiology**, v. 52, n. 5, p. 427-433, 2003.
- BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- BUSH, K., G. A. JACOBY, and A. A. MEDEIROS. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1211–1233.
- CABRAL, Adriane Borges et al. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572-578, 2012.
- CAMARGO, Samuel Barbosa; DE VASCONCELOS, Darizy Flavia Silva Amorim. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpeno. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 381-387, 2015.
- CHANG, M-Y.; SHEN, Y-L. Linalool Exhibits Cytotoxic Effects by Activating Antitumor Immunity. **Molecules**, Basel, v. 19, n. 5, p. 6694- 6706, 2014.
- CHUNG, Pooi Yin. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 20, 2016.

CLEGG, Steven; MURPHY, Caitlin N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 1, 2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S26. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 26th informational supplement. Wayne, PA: CLSI. 2016.

COURVALIN, P., GOLDSTEIN, F., PHILIPPON, A. & SIROT, J. **L'antibiogramme** 1 ed. V. 2 p. 199-215 Paris-Brussels. Mpc-Vigot, 1985.

DEWICK, Paul M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

DI SOTTO, Antonella et al. Genotoxicity of lavender oil, linalyl acetate, and linalool on human lymphocytes in vitro. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 52, n. 1, p. 69-71, 2011.

DU, J.; LI, P.; LIU, H. Phenotypic and molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university teaching hospital, China. **PLoS One**. v. 16;9(4), p. e95181, 2014.

DUAN, Huiyong et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental research**, v. 109, n. 5, p. 511-517, 2009.

DUCOMBLE, T. et al. Large hospital outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*: investigating mortality and the impact of screening for KPC-2 with polymerase chain reaction. **Journal of Hospital Infection**, v. 89, n. 3, p. 179-185, 2015.

DURANTE-MANGONI, Emanuele et al. Do we still need the aminoglycosides?. **International journal of antimicrobial agents**, v. 33, n. 3, p. 201-205, 2009.

ELEMAM, Azza; RAHIMIAN, Joseph; DOYMAZ, Mehmet. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3558-3562, 2010.

ESCANDÓN-VARGAS, Kevin et al. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 15, n. 3, p. 277-297, 2017.

GIACOBBE, Daniele Roberto et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case-control-control study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 12, p. 1106. e1-1106. e8, 2015.

GOMEZ-SIMMONDS, Angela; UHLEMANN, Anne-Catrin. Clinical implications of genomic adaptation and evolution of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. suppl_1, p. S18-S27, 2017.

GUPTA, Priyanka et al. Citral, a monoterpenoid aldehyde interacts synergistically with norfloxacin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 34, p. 85-96, 2017.

JAMAL, Muhsin et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, 2017.

JACOBS, David M. et al. Triple combination antibiotic therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 76, 2017.

JÁCOME, Paula Regina Luna et al. Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM and blaCTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. **Journal of medical microbiology**, v. 65, n. 7, p. 658-665, 2016.

JEANNOT, Katy; BOLARD, Arnaud; PLÉSIAT, Patrick. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 49, n. 5, p. 526-535, 2017.

KARAIKOS, Ilias; ANTONIADOU, Anastasia; GIAMARELLOU, Helen. Combination therapy for extensively-drug resistant gram-negative bacteria. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 15, n. 12, p. 1123-1140, 2017.

KHAN, Mohd Sajjad Ahmad; MALIK, Abida; AHMAD, Iqbal. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p. 33-42, 2012.

KONEMAN, Elmer W.; ALLEN, Stephen. **Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas**. Ed. Médica Panamericana, 2008.

LEE, Spencer; AL RAZQAN, Ghaida Saleh; KWON, Dong H. Antibacterial activity of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its synergism with β -lactam antibiotics sensitizing carbapenem-associated multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine**, v. 24, p. 49-55, 2017.

LEE, Chang-Ro et al. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 895, 2016.

LEITE, Maria Clerya Alvino et al. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

LI, Bei et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071-1081, 2014.

LIMA, Patricia Rodrigues et al. 1, 8-cineole (eucalyptol) ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis via modulation of cytokines, oxidative stress and NF- κ B activity in mice. **Life sciences**, v. 92, n. 24, p. 1195-1201, 2013.

LIVERMORE, David M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?. **Clinical infectious diseases**, v. 34, n. 5, p. 634-640, 2002.

LORIAN, Victor (Ed.). **Antibiotics in laboratory medicine**. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

MAREI, G. L. et al. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.103, p. 56-61, 2012.

MARTIN, Rebekah M.; BACHMAN, Michael. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 4, 2018.

MIRON, Diogo et al. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, n. 6, p. 660-667, 2014.

MONTEIRO, Jussimara et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.

NAAS, Thierry; DORTET, Laurent; I IORGA, Bogdan. Structural and functional aspects of class A carbapenemases. **Current drug targets**, v. 17, n. 9, p. 1006-1028, 2016.

N'GUYEN, Y.; BAUMARD, S. Tetraciclinas. Glicilciclinas. **EMC-Tratado de Medicina**, v. 17, n. 1, p. 1-6, 2013.

OLIVEIRA, DS de. INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA: PARTE II.

PACZOSA, Michelle K.; MECSAS, Joan. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PEANA, A. T.; DE MONTIS, M. G.; NIEDDU, E.; SPANO, M. T.; D'AQUILA, P. S.; PIPPIA, P. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. *Eur J Pharmacol.*, v.485, n.1-3 , p.165-174, 2004

PELLEGRINI, Marika et al. Characterization of Essential Oils Obtained from Abruzzo Autochthonous Plants: Antioxidant and Antimicrobial Activities Assessment for Food Application. **Foods**, v. 7, n. 2, p. 19, 2018.

PEREIRA-MAIA, Elene Cristina et al. Tetracyclines and glycyclines: an overview. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

PITOUT, Johann DD; NORDMANN, Patrice; POIREL, Laurent. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873-5884, 2015.

POIREL, Laurent; JAYOL, Aurélie; NORDMANN, Patrice. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 2, p. 557-596, 2017.

POURNARAS, Spyros et al. Current perspectives on tigecycline resistance in Enterobacteriaceae: susceptibility testing issues and mechanisms of resistance. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 1, p. 11-18, 2016.

RAMIREZ, Maria S.; TOLMASKY, Marcelo E. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2267, 2017.

ROBERTS, Susan C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. **Nature chemical biology**, v. 3, n. 7, p. 387, 2007.

ROBERTS, Kade D. et al. Antimicrobial activity and toxicity of the major lipopeptide components of polymyxin B and colistin: last-line antibiotics against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **ACS infectious diseases**, v. 1, n. 11, p. 568-575, 2015.

ROSA, M. do S. S. et al. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003

ROSENBLUM, R. et al. Genetic regulation of the ramA locus and its expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 38, n. 1, p. 39-45, 2011.

ROJAS, Laura J. et al. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: laboratory detection and impact on mortality. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 6, p. 711-718, 2016.

RUZIN, Alexey; IMMERMANN, Frederick W.; BRADFORD, Patricia A. Real-time PCR and statistical analyses of *acrAB* and *ramA* expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3430-3432, 2008.

SARTORATTO, Adilson et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004

SEOL, Geun-Hye et al. Antioxidant activity of linalool in patients with carpal tunnel syndrome. **BMC neurology**, v. 16, n. 1, p. 17, 2016.

SHI, Chao et al. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0159006, 2016.

SINGH, Bharat; SHARMA, Ram A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 129-151, 2015.

Sigma Aldrich, 2017. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com>

SOUTO, Ingrid Carneiro Cavalcante et al. Atividades farmacológicas do monoterpeno 1, 8-cineol: um estudo in silico. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 6, n. 3, p. 26-28, 2016.

SWAMY, Mallappa Kumara; AKHTAR, Mohd Sayeed; SINNIHA, Uma Rani. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

TAKAHASHI, Yoshiaki; IGARASHI, Masayuki. Destination of aminoglycoside antibiotics in the 'post-antibiotic era'. **The Journal of antibiotics**, v. 71, n. 1, p. 4, 2018.

TANG, Hung-Jen et al. Colistin-sparing regimens against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates: Combination of tigecycline or doxycycline and gentamicin or amikacin. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2016.

TRIMBLE, Michael J. et al. Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 10, p. a025288, 2016.

TUMBARELLO, Mario et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 7, p. 2133-2143, 2015.

VELEBA, Mark; SCHNEIDERS, Thamarai. Tigecycline resistance can occur independently of the *ramA* gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4466-4467, 2012.

VERA-LEIVA, Alejandra et al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, main carbapenemase in Enterobacteriaceae. **Rev. chil. infectol.**, Santiago, v. 34, n. 5, p. 476-484, Oct. 2017.

VIEIRA, A. J. et al. Limonene: Aroma of innovation in health and disease. **Chemico-biological interactions**, 2018.

VIRIATO, Airton. Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida Berkhout*, causadoras de infecções hospitalares. **O Mundo Da Saúde**, v. 38, n. 1, p. 40-50, 2014.

VUOTTO, Claudia et al. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743-758, 2014.

WAGNER, Hildebert; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009.

WANG, Zhe et al. Risk Factors for Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection and Mortality of *Klebsiella pneumoniae* Infection. **Chinese medical journal**, v. 131, n. 1, p. 56, 2018.

WENTAO, Ni et al. In vitro activity of minocycline combined with aminoglycosides against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. **The Journal of antibiotics**, p. 1, 2018.

XU, Zhenbo et al. Effect of aminoglycosides on the pathogenic characteristics of microbiology. **Microbial pathogenesis**, 2017.

YE, Yafei et al. Mechanism for carbapenem resistance of clinical Enterobacteriaceae isolates. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1143-1149, 2018.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

ZHENG, Si-Han et al. Risk factors, outcomes and genotypes of carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: a three-year retrospective study in a large tertiary hospital in Northern China. **Infectious Diseases**, p. 1-9, 2018.