

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO LIMONENO CONTRA *Klebsiella pneumoniae*

Isaac Moura Araújo¹;

¹Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<http://lattes.cnpq.br/4804278307317640>

Francisca Daliane Severino da Silva²;

²Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<http://lattes.cnpq.br/4216348227755592>

Leandro Marques Correia³;

³Universidade Federal do Cariri-UFCA.

<https://lattes.cnpq.br/7115185393957046>

Renata Evaristo Rodrigues Duarte⁴;

⁴Centro Universitário Leão Sampaio-UNILEÃO.

<https://lattes.cnpq.br/9143816484570239>

Nélio Barreto Vieira⁵;

⁵Departamento de Medicina, Universidade Federal do Cariri-UFCA.

<http://lattes.cnpq.br/1710661429430020>

Cícera Georgia Brito Milfont⁶;

⁶Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<https://lattes.cnpq.br/2225471586878849>

Hallana de Lima Teles⁷;

⁷Secretaria Municipal de Saúde do Crato

<https://lattes.cnpq.br/2299782506588102>

Maira Pereira Sampaio Macêdo⁸;

⁸Programa De Pós-graduação Em Saúde Da Família - PPGSF/RENASF/URCA.

<http://lattes.cnpq.br/0656629484039684>

Jamilla Nogueira Landim Rufino⁹;

⁹Pós-graduação em Enfermagem do Trabalho – DNA.

<http://lattes.cnpq.br/7004280283424891>

Márcio Fernando Gonçalves Araújo¹⁰;

¹⁰Departamento de Medicina, Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte/FMJ.

<http://lattes.cnpq.br/3445395776092381>

Maria Alicia Cavalcante Narciso¹¹;

¹¹Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<https://lattes.cnpq.br/2007709963059526>

Cícera Datiane de Moraes Oliveira Tintino¹²;

¹²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<https://lattes.cnpq.br/0055673963995814>

RESUMO: A resistência bacteriana em *Klebsiella pneumoniae* representa um desafio crítico para a saúde pública, especialmente devido à sua capacidade de produzir β -lactamases e de apresentar elevada impermeabilidade da membrana externa. Nesse cenário, compostos naturais como terpenos vêm sendo investigados como possíveis adjuvantes terapêuticos capazes de modular a atividade antimicrobiana convencional. O limoneno, um monoterpene abundantemente encontrado em frutos cítricos, possui atividades biológicas relevantes, embora sua eficácia contra bactérias Gram-negativas permaneça pouco explorada. A atividade moduladora do limoneno foi avaliada utilizando o método de microdiluição em caldo, determinando-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antibióticos gentamicina, norfloxacino, ceftazidima e polimixina B isolados ou combinados com o terpeno. As análises seguiram protocolo padrão, com preparação das suspensões bacterianas em escala 0,5 de McFarland e incubação em microplacas de 96 poços. Os resultados demonstraram que o limoneno exerceu modulação limitada frente a *K. pneumoniae*. A única alteração observada ocorreu para norfloxacino, cuja CIM apresentou redução discreta em comparação ao antibiótico isolado. Para gentamicina, polimixina B e ceftazidima, nenhum efeito modulador foi detectado, indicando baixa interferência do terpeno sobre a permeabilidade da membrana externa ou sobre mecanismos de resistência intrínsecos da espécie. O limoneno mostrou atuação restrita como adjuvante antimicrobiano contra *K. pneumoniae*, evidenciando que sua interação com a barreira lipopolissacarídica da bactéria é limitada. Embora apresente potencial farmacológico em outros contextos, sua aplicabilidade como modulador da atividade antibiótica em Gram-negativas parece reduzida, demandando investigações adicionais com formulações alternativas ou concentrações superiores.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência bacteriana. Terpenos. Limoneno. Modulação antibiótica.

ABSTRACT: Bacterial resistance in *Klebsiella pneumoniae* represents a critical challenge for public health, especially due to its ability to produce β -lactamases and its high impermeability of the outer membrane. In this scenario, natural compounds such as terpenes have been investigated as possible therapeutic adjuvants capable of modulating conventional antimicrobial activity. Limonene, a monoterpene abundantly found in citrus fruits, has relevant biological activities, although its effectiveness against Gram-negative bacteria remains poorly explored. The modulating activity of limonene was evaluated using the broth microdilution method, determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the antibiotics gentamicin, norfloxacin, ceftazidime, and polymyxin B, isolated or combined with the terpene. The analyses followed a standard protocol, with preparation of bacterial suspensions on a 0.5 McFarland scale and incubation in 96-well microplates. The results demonstrated that limonene exerted limited modulation against *K. pneumoniae*. The only alteration observed occurred for norfloxacin, whose MIC showed a slight reduction compared to the antibiotic alone. For gentamicin, polymyxin B, and ceftazidime, no modulating effect was detected, indicating low interference of the terpene on the permeability of the outer membrane or on intrinsic resistance mechanisms of the species. Limonene showed restricted activity as an antimicrobial adjuvant against *K. pneumoniae*, evidencing that its interaction with the lipopolysaccharide barrier of the bacteria is limited. Although it presents pharmacological potential in other contexts, its applicability as a modulator of antibiotic activity in Gram-negative bacteria seems reduced, requiring further investigations with alternative formulations or higher concentrations.

KEY-WORDS: Bacterial resistance. Terpenes. Limonene. Antibiotic modulation.

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana representa um dos maiores desafios contemporâneos para a saúde pública, afetando significativamente a eficácia dos antibióticos disponíveis. O uso disseminado e muitas vezes inadequado desses fármacos favorece a seleção de microrganismos capazes de desenvolver mecanismos variados de resistência, incluindo produção de enzimas inativadoras, alteração de alvos, redução de permeabilidade e ativação de bombas de efluxo (Munita & Arias, 2016). A crescente prevalência de bactérias multirresistentes compromete a eficácia terapêutica e estimula a busca por alternativas complementares capazes de restaurar a atividade antimicrobiana.

Entre os patógenos de maior relevância clínica, *Klebsiella pneumoniae* se destaca por sua elevada capacidade de adquirir determinantes genéticos de resistência, especialmente genes codificadores de β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs) e carbapenemases (Navon-Venezia et al., 2017). Além disso, fatores como a presença de cápsula espessa,

produção de sideróforos, formação de biofilmes e resistência intrínseca a diversos antibióticos tornam essa espécie um importante agente de infecções hospitalares. Sua habilidade adaptativa reforça a necessidade de estratégias terapêuticas que ultrapassem os limites da antibioticoterapia tradicional.

Diante da crescente dificuldade no tratamento de infecções por *K. pneumoniae*, produtos naturais têm emergido como alternativas promissoras ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e moduladores da resistência. Metabólitos secundários provenientes de plantas, como flavonoides, alcaloides e terpenos, têm demonstrado capacidade de interferir em processos biológicos essenciais das bactérias, apresentando ainda a vantagem de atuarem em múltiplos alvos (Cushnie e Lamb, 2011). Essa característica reduz a probabilidade de desenvolvimento rápido de resistência.

Entre esses compostos, os terpenos são especialmente interessantes devido à sua lipofilicidade e seu potencial de interação direta com membranas biológicas bacterianas. Estudos mostram que terpenos podem comprometer a integridade da membrana externa de Gram-negativas, promover alterações de permeabilidade, afetar o potencial de membrana e aumentar o influxo de antibióticos, favorecendo sinergismo (Burt, 2004; Nazzaro et al., 2013).

No contexto da resistência antimicrobiana, o limoneno apresenta interesse particular por sua capacidade de atuar sobre a membrana citoplasmática, promovendo desorganização lipídica, extravasamento iônico e redução do potencial de membrana (Burt, 2004). Alguns estudos sugerem ainda que o limoneno possa influenciar a permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas, potencializando o efeito de determinados antibióticos (Swamy et al., 2016). Assim, investigar o impacto do limoneno na suscetibilidade de *K. pneumoniae* representa uma estratégia promissora na busca por adjuvantes terapêuticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os antibióticos, o limoneno e a resazurina foram adquiridos na Sigma Aldrich, todos foram diluídos em DMSO e completados com água destilada estéril até a concentração final de 1024 µg/mL.

Avaliação da atividade antibacteriana

✓ Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por meio do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM). A cepa bacteriana utilizada, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, foi previamente cultivada em meio Brain Heart Infusion (BHI) ágar, em incubadora bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Em seguida, prepararam-se tubos Eppendorf® contendo 900 µL de

BHI 10% e 100 µL da suspensão bacteriana, previamente diluída em solução salina até alcançar uma concentração de aproximadamente 10⁵ UFC/mL.

As microplacas de 96 poços foram preenchidas numericamente, adicionando-se 100 µL desta suspensão bacteriana em cada poço. Posteriormente, foi realizada microdiluição seriada com uma solução do limoneno, em concentrações variando de 512 a 8 µg/mL. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas, e a determinação da CIM foi efetuada utilizando resazurina como indicador. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato na qual não se observou crescimento bacteriano visível, conforme descrito por Coutinho *et al.*, 2008 e Javadpour *et al.*, 1996. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata (n = 3).

✓ Atividade modificadora da ação dos antibióticos

A avaliação da atividade potencializadora de antibióticos foi conduzida com a combinação do limoneno com os antibióticos gentamicina, polimixina-B, norfloxacino e ceftazidima, que também foram testados individualmente. A cepa bacteriana utilizada, foi *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

A metodologia proposta por Coutinho et al. (2008) foi utilizada para avaliar o potencial modificador da resistência bacteriana a antibióticos exercido pelo limoneno. A solução foi diluída até uma concentração subinibitória (MIC/8). O meio foi preparado em tubos Eppendorf® contendo BHI (10%) + 150 µL da suspensão bacteriana + 188 µL de α-pineno, totalizando 1,5 mL de solução. Para o controle, a solução de 1,35 mL continha apenas BHI (10%) + 150 µL da suspensão microbiana. A placa de microdiluição foi preenchida em ordem alfabética, adicionando-se 100 µL da solução de distribuição a cada poço. Em seguida, realizou-se microdiluição seriada (proporção 1:1) com 100 µL do antibiótico (1024 µg/mL), até o penúltimo poço. As placas foram então incubadas a 37 °C por 24 horas. As concentrações do antibiótico variaram gradualmente de 512 a 1 µg/mL. A leitura foi realizada da mesma forma que o teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima).

Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos como média geométrica ± desvio padrão da média (± SED), avaliados estatisticamente por análise de variância (two-way ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni utilizando o software *GraphPad Prism 8.3*. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados obtidos com o limoneno revelou um perfil modulador variável, afetando de maneira distinta as diferentes classes de antibióticos avaliadas. Para

gentamicina, observou-se uma redução significativa da MIC, que passou de 50,79 µg/mL para 32 µg/mL. Essa modulação pode ser explicada pela capacidade do limoneno de promover alterações na fluidez da membrana, facilitando a entrada de aminoglicosídeos, cuja eficácia depende do transporte ativo dependente do potencial de membrana (Hyldgaard et al., 2012). Essa permeabilização pode ter favorecido a difusão da gentamicina, justificando o efeito observado.

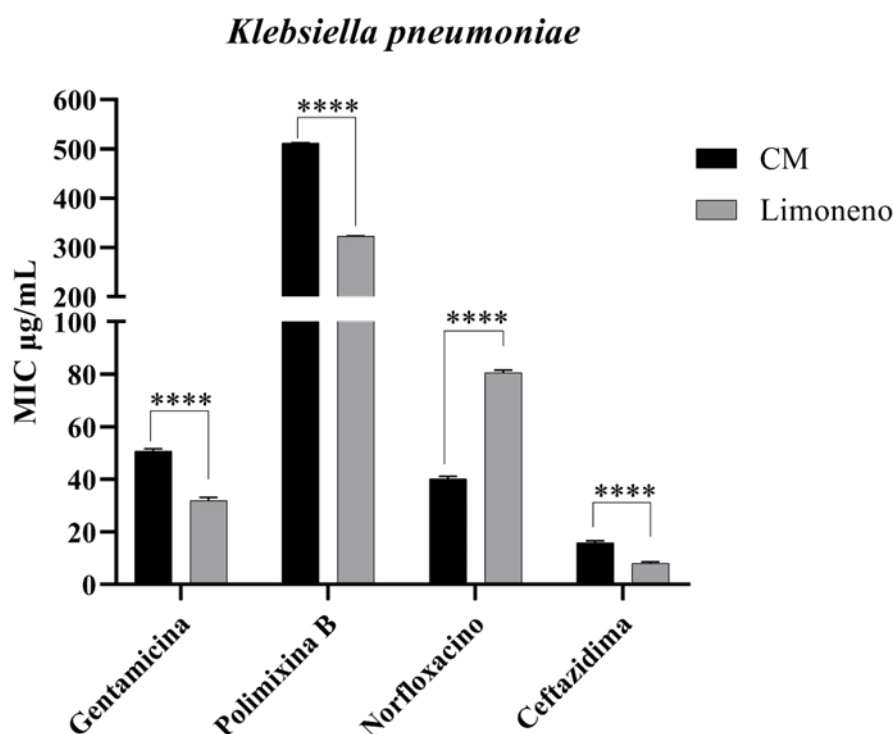
No caso da polimixina B, houve redução da MIC de 512 para aproximadamente 322 µg/mL. Embora a polimixina já atue diretamente na membrana externa de Gram-negativas, o limoneno pode potencializar esse mecanismo ao desestabilizar o lipopolissacarídeo (LPS), favorecendo o dano estrutural. Esse tipo de sinergismo entre compostos lipofílicos e antibióticos polimixínicos é bem documentado, especialmente quando há aumento do extravasamento de componentes celulares e intensificação da perda de integridade da membrana (Gonçalves et al., 2021).

Por outro lado, o limoneno promoveu um aumento na MIC do norfloxacino, passando de 40,31 µg/mL para 80,63 µg/mL, indicando um possível antagonismo. Essa modulação negativa pode estar associada à desorganização excessiva da membrana externa, levando ao comprometimento das porinas responsáveis pelo influxo de quinolonas. Estudos mostram que perturbações estruturais intensas na membrana podem reduzir a entrada de antibióticos hidrofílicos, incluindo fluoroquinolonas, o que pode explicar a maior resistência observada (Balouiri et al., 2020).

Em contraste, ceftazidima apresentou modulação positiva, com redução da MIC de 16 para 8 µg/mL. A entrada de β-lactâmicos depende da integridade e funcionalidade das porinas, além da permeabilidade da membrana externa. Assim, alterações moderadas promovidas pelo limoneno podem ter favorecido o acesso do antibiótico às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), resultando na diminuição da MIC. Esse comportamento coaduna com estudos que mostram que perturbações controladas da membrana externa podem melhorar a ação de antibióticos β-lactâmicos, especialmente em bactérias com produção moderada de β-lactamases (Marchese *et al.*, 2016).

De forma geral, o limoneno apresentou comportamento modulador heterogêneo, com sinergismo parcial para gentamicina, polimixina B e ceftazidima, mas antagonismo para norfloxacino. Essa divergência reforça que os efeitos dos terpenos dependem tanto de sua intensidade de perturbação de membrana quanto da rota de entrada e mecanismo de ação de cada antibiótico.

Figura 1: Gráfico mostrando as concentrações de antibióticos combinados com limoneno contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603; valores de MIC ($\mu\text{g/mL}$); “****” $p < 0,0001$ indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias e teste post-hoc de Bonferroni.



CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o limoneno apresenta um efeito modulador limitado sobre a suscetibilidade de *Klebsiella pneumoniae* aos antibióticos avaliados. Embora tenha sido observada uma redução moderada na CIM do norfloxacin quando combinado ao terpeno, o limoneno não exerceu impacto significativo sobre a atividade da gentamicina, ceftazidima ou polimixina B. Esses achados sugerem que, apesar de possuir propriedades biológicas amplamente relatadas na literatura, o limoneno não promove alterações substanciais na permeabilidade ou integridade da membrana externa de *K. pneumoniae*, característica essencial para superar a elevada barreira imposta pela LPS e pelas bombas de efluxo dessa espécie. Dessa forma, embora o limoneno permaneça um composto de interesse no contexto de produtos naturais bioativos, sua aplicação como adjuvante antimicrobiano contra *K. pneumoniae* parece restrita, requerendo investigações adicionais que explorem diferentes concentrações, formulações ou estratégias de encapsulamento capazes de aumentar sua biodisponibilidade e interação com alvos bacterianos.

REFERÊNCIAS

- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- COUTINHO, Henrique D M *et al.* Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, [s. l.], vol. 54, nº 4, p. 328–330, 2008.
- CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 38, n. 2, p. 99–107, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>
- GONÇALVES, G. M. S.; CAMPOS, L. M.; ANDRADE, B. F. Interaction between essential oil components and polymyxins: implications in membrane permeabilization. *Phytomedicine*, v. 88, p. 153604, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153604>
- HYLDGAARD, M. *et al.* The antimicrobial mechanism of action of essential oils: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 141, p. 93–102, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.030>
- JAVADPOUR, Maryam M *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of medicinal chemistry*, [s. l.], vol. 39, nº 16, p. 3107–3113, 1996.
- MARCHESE, A. *et al.* Antibacterial and anti-biofilm properties of essential oils and plant-derived compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 6, p. 708, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18030608>
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, v. 4, n. 2, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARMELI, Y. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, n. 3, p. 252–275, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- NAZZARO, F. *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- SWAMY, M. K. *et al.* Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 5, n. 2, p. 7–15, 2016.