

EFEITOS DO A-PINENO SOBRE A SUSCETIBILIDADE DE *Klebsiella pneumoniae*

Isaac Moura Araújo¹;

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

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

Cícera Laura Roque Paulo²;

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

<http://lattes.cnpq.br/1904638253072990>

Francisca Daliane Severino da Silva³;

³Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

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

Sara Tavares de Sousa Machado⁴;

⁴Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<http://lattes.cnpq.br/0133144032529157>

Guilherme Maciel Honor de Brito⁵;

⁵Universidade Estadual do Ceará-UECE.

<http://lattes.cnpq.br/8143325544434884>

Leandro Marques Correia⁶;

⁶Universidade Federal do Cariri-UFCA.

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

Nélio Barreto Vieira⁷;

⁷Departamento de Medicina, Universidade Federal do Cariri-UFCA.

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

Cícera Georgia Brito Milfont⁸;

⁸Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

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

Márcio Fernando Gonçalves Araújo⁹;

⁹Departamento de Medicina, Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte–FMJ.

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

Lucas dos Santos Sá¹⁰;

¹⁰Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<http://lattes.cnpq.br/1596856697909046>

Alisson Justino Alves da Silva¹¹;

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

<http://lattes.cnpq.br/69999167726496993>

Cícera Datiane de Moraes Oliveira Tintino¹²;

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

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

RESUMO: O avanço da resistência antimicrobiana em *Klebsiella pneumoniae* tem fomentado a busca por novas estratégias complementares ao tratamento convencional. Terpenos vêm se destacando como alternativas naturais capazes de interferir em mecanismos de resistência bacteriana. O α -pineno, um monoterpene amplamente distribuído em plantas aromáticas, é reconhecido por seu potencial de interagir com membranas biológicas, o que o torna um candidato promissor para estudos de modulação antibiótica. O efeito modulador do α -pineno foi investigado por meio do método de microdiluição em caldo, determinando-se as CIMs de gentamicina, norfloxacin, ceftazidima e polimixina B isolados e em combinação com o terpeno. As suspensões bacterianas foram padronizadas em 0,5 McFarland e incubadas em microplacas de 96 poços conforme metodologia CLSI adaptada. O α -pineno apresentou o perfil modulador mais significativo entre os terpenos avaliados. Houve redução expressiva das CIMs de gentamicina, ceftazidima e polimixina B, sugerindo sinergismo entre o terpeno e esses antibióticos. Para polimixina B, observou-se redução de 512 para 256 $\mu\text{g/mL}$, enquanto ceftazidima e gentamicina também apresentaram reduções marcantes. A modulação do norfloxacin foi menos acentuada, porém ainda evidente. Esses dados sugerem que o α -pineno favorece a permeabilidade da membrana ou interfere na homeostase celular bacteriana. O α -pineno demonstrou forte potencial como adjuvante antimicrobiano contra *K. pneumoniae*, promovendo significativa redução da CIM de diversos antibióticos. Os achados reforçam sua capacidade de comprometer barreiras estruturais da bactéria, tornando-o um composto promissor para o desenvolvimento de novas estratégias combinatórias no enfrentamento da resistência antimicrobiana.

PALAVRAS CHAVE: Resistência bacteriana. Terpenos. α -Pineno. Sinergismo antibiótico.

ABSTRACT: The rise in antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* has fueled the search for new strategies to complement conventional treatment. Terpenes have emerged as natural alternatives capable of interfering with bacterial resistance mechanisms. α -Pinene, a monoterpene widely distributed in aromatic plants, is recognized for its potential to interact with biological membranes, making it a promising candidate for antibiotic modulation studies. The modulating effect of α -pinene was investigated using the broth microdilution method, determining the MICs of gentamicin, norfloxacin, ceftazidime, and polymyxin B, both alone and in combination with the terpene. Bacterial suspensions were standardized to 0.5 McFarland and incubated in 96-well microplates according to an adapted CLSI methodology. α -Pinene showed the most significant modulating profile among the terpenes evaluated. There was a significant reduction in the MICs of gentamicin, ceftazidime, and polymyxin B, suggesting synergism between the terpene and these antibiotics. For polymyxin B, a reduction from 512 to 256 $\mu\text{g/mL}$ was observed, while ceftazidime and gentamicin also showed marked reductions. The modulation of norfloxacin was less pronounced, but still evident. These data suggest that α -pinene favors membrane permeability or interferes with bacterial cell homeostasis. α -Pinene demonstrated strong potential as an antimicrobial adjuvant against *K. pneumoniae*, promoting a significant reduction in the MIC of several antibiotics. The findings reinforce its ability to compromise the bacterium's structural barriers, making it a promising compound for the development of new combinatorial strategies in addressing antimicrobial resistance.

KEY-WORDS: Bacterial resistance. Terpenes. α -Pinene. Antibiotic synergism.

INTRODUÇÃO

A progressão da resistência bacteriana compromete significativamente a eficácia dos antibióticos, resultando em infecções graves e de difícil tratamento. A seleção natural favorecida pelo uso inadequado desses fármacos permite que microrganismos desenvolvam mecanismos refinados de resistência, entre eles produção de enzimas inativadoras, bombas de efluxo, modificação de alvos e alterações na permeabilidade celular (Munita & Arias, 2016). Esse contexto desafia a medicina clínica e torna urgente a busca por novas alternativas terapêuticas.

Klebsiella pneumoniae figura entre os patógenos mais críticos desse cenário. Este bacilo Gram-negativo é amplamente reconhecido por sua capacidade de adquirir plasmídeos contendo genes de ESBLs e carbapenemases, tornando-se resistente às principais classes de antibióticos β -lactâmicos (Navon-Venezia et al., 2017). Além disso, sua cápsula espessa, sistemas de sideróforos e a habilidade de formar biofilmes conferem elevada virulência e persistência em ambientes clínicos, tornando-a responsável por surtos hospitalares e por

infecções associadas a dispositivos médicos.

Nesse contexto de resistência crescente, compostos naturais têm sido investigados como potenciais ferramentas terapêuticas. Diversas moléculas bioativas presentes em plantas demonstram atividade antimicrobiana e moduladora, com destaque para terpenos, que possuem estruturas altamente lipofílicas capazes de interagir diretamente com componentes das membranas bacterianas (Cushnie & Lamb, 2011). Essa interação pode resultar em alterações de fluidez, perda de integridade e aumento da permeabilidade.

O α -pineno, um monoterpreno presente em plantas como *Pinus spp.* e *Rosmarinus officinalis*, tem sido amplamente estudado por sua atividade biológica, incluindo ação antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante (Salehi et al., 2019). No contexto antimicrobiano, o α -pineno pode comprometer a membrana citoplasmática, promover lise celular e interferir no metabolismo energético bacteriano. Estudos recentes demonstram que monoterprenos, incluindo o α -pineno, modulam vias relacionadas ao estresse oxidativo e à integridade celular, podendo atuar sinergicamente com antibióticos ao afetar permeabilidade e mecanismos adaptativos (Filomeni et al., 2022). Assim, sua utilização frente a *K. pneumoniae* representa uma abordagem relevante no combate à resistência.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os antibióticos, o α -pineno 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 $\mu\text{g/mL}$.

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 10^5 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 α -pineno, em concentrações variando de 512 a 8 $\mu\text{g/mL}$. 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 α -pineno 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 α -pineno. A solução foi diluída até uma concentração subinibitória (MIC/8). O meio foi preparado em tubos Eppendorf® contendo BHI (10%) + 150 μ L da suspensão bacteriana + 188 μ L de α -pineno, totalizando 1,5 mL de solução. Para o controle, a solução de 1,35 mL continha apenas BHI (10%) + 150 μ L da suspensão microbiana. A placa de microdiluição foi preenchida em ordem alfabética, adicionando-se 100 μ L da solução de distribuição a cada poço. Em seguida, realizou-se microdiluição seriada (proporção 1:1) com 100 μ L do antibiótico (1024 μ g/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 μ g/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 $\pm$ desvio padrão da média ($\pm$ 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 envolvendo alfa-pineno mostrou que esse monoterpene apresenta efeitos substanciais sobre a susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae* a diferentes classes de antibióticos, embora de modo seletivo e dependente do mecanismo de ação do fármaco. Para gentamicina, houve apenas uma discreta redução da MIC, passando de 50,79 μ g/mL para 40,31 μ g/mL (figura 1). Esses dados sugerem que o alfa-pineno pode exercer um efeito de permeabilização leve sobre a membrana externa da bactéria. A literatura demonstra que o alfa-pineno interage fisicamente com membranas bacterianas, provocando distúrbios no empacotamento lipídico e alterando a fluidez (Nazzaro et al., 2013; Chen et al., 2021). No entanto, em Gram-negativas como *K. pneumoniae*, a presença do LPS atua como barreira importante, o que pode limitar a extensão do dano, justificando

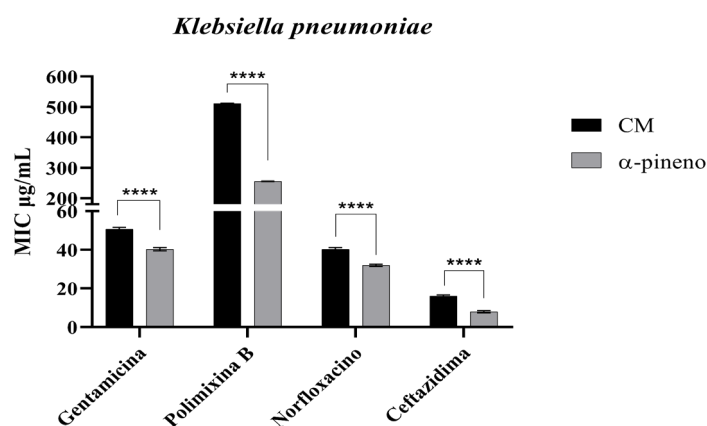
a modulação mais discreta observada.

Por outro lado, a redução mais pronunciada foi observada para polimixina B, cuja MIC diminuiu de 512 µg/mL para 256 µg/mL. Essa queda representa um efeito modulador considerável, especialmente levando-se em conta que a polimixina B já atua na membrana externa. O alfa-pineno pode potencializar esse mecanismo ao facilitar a desestabilização do LPS e da bicamada fosfolipídica interna, amplificando a penetração da polimixina. Esse tipo de interação sinérgica entre monoterpenos e antibióticos polimixínicos já foi registrada em estudos que demonstram aumento do dano à integridade da membrana, mensurado por extravasamento de marcadores fluorescentes e perda de gradientes iônicos essenciais (Sánchez et al., 2020).

A avaliação da modulação do norfloxacino revelou redução da MIC de 40,31 µg/mL para 32 µg/mL, indicando um efeito sinérgico suave. Considerando que quinolonas dependem de boa permeabilidade por porinas, o alfa-pineno pode contribuir para aumentar o influxo do antibiótico. Diferente do limoneno, que em alguns casos pode causar desorganização que reduz a entrada de quinolonas, o alfa-pineno parece produzir um impacto menos agressivo sobre a membrana externa, o que pode ter favorecido a modulação positiva. Estudos sugerem que o alfa-pineno causa menor perturbação do sistema de porinas em comparação com monoterpenos mais hidrofóbicos, preservando parcialmente as vias de entrada de moléculas hidrofílicas (Filomeni et al., 2022).

A ceftazidima também apresentou queda marcante na MIC, de 16 µg/mL para 8 µg/mL. Como antibiótico β-lactâmico, sua eficácia depende do acesso às PBPs localizadas no periplasma, e o alfa-pineno pode ter facilitado esse acesso ao comprometer a integridade da membrana externa. Além disso, há evidências de que o alfa-pineno pode interferir em respostas de estresse relacionadas à integridade celular e potencial de membrana, o que poderia reduzir a expressão ou eficiência de β-lactamases induzidas (Santoyo et al., 2021). Assim, a combinação dos mecanismos físicos e biológicos pode explicar a modulação mais evidente observada para a ceftazidima.

Figura 1: Gráfico mostrando as concentrações de antibióticos combinados com alfa-pineno 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.



Esses achados demonstram que o alfa-pineno apresenta capacidade moduladora promissora, especialmente com polimixina B e ceftazidima, enquanto os efeitos sobre gentamicina e norfloxacino são mais discretos, porém ainda positivos. Os resultados reforçam que esse terpeno pode atuar como adjuvante antibacteriano relevante, principalmente ao favorecer o dano à barreira externa característica de *K. pneumoniae*.

CONCLUSÃO

O α -pineno apresentou o perfil modulador mais promissor entre os terpenos testados, evidenciado pela redução significativa das CIMs combinadas de gentamicina, ceftazidima e polimixina B frente a *Klebsiella pneumoniae*. Tais resultados indicam que o α -pineno pode favorecer o acesso dos antibióticos a seus alvos intracelulares ou comprometer mecanismos de resistência, como barreiras de membrana e sistemas de efluxo. A queda de 50% na CIM da polimixina B e a redução expressiva observada para ceftazidima sugerem potencial sinergismo, o que está de acordo com estudos prévios que descrevem a capacidade do α -pineno de desestruturar membranas ricas em lipopolissacarídeos e interferir na estabilidade da parede celular. Esse perfil fortalece a perspectiva de seu uso como adjuvante terapêutico, especialmente diante da crescente prevalência de cepas resistentes de *K. pneumoniae*. Assim, o α -pineno se destaca como um candidato viável para pesquisas translacionais voltadas ao desenvolvimento de novas combinações terapêuticas utilizando produtos naturais.

REFERÊNCIAS

- CHEN, J. et al. Antibacterial activity and membrane-disruptive mechanism of monoterpenes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 105, p. 8841–8853, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11642-7>.
- COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, v. 54, p. 328–330, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1159/000151699>.
- CUSHNIE, T. P. T.; 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>.
- FILOMENI, G. et al. Monoterpenes in biological systems: modulation of oxidative stress, membrane integrity, and cellular signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 150, p. 112–125, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112943>.
- JAVADPOUR, M. M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 16, p. 3107–3113, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm960196y>.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, v. 4, n. 2, p. 1–37, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.
- NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. 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. Essential oils and antimicrobial activity. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph6121451>.
- SALEHI, B. et al. Antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory potential of essential oils: a comprehensive review. *Cells*, v. 8, n. 10, p. 1–55, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells8101232>.
- SÁNCHEZ, E. et al. Antibacterial and antibiofilm activity of essential oil components against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Microbial Pathogenesis*, v. 149, p. 1–9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104561>.
- SANTOYO, S. et al. Antibacterial effects of essential oils and terpenes: mechanisms and applications. *Plants*, v. 10, n. 11, p. 1–22, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10112310>.
- VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.