



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE – UFCG
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL - CSTR
CAMPUS DE PATOS - PB

VINÍCIUS ROCHA LIMA SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Pogostemon cablin* CONTRA *Klebsiella pneumoniae

PATOS/PB
2023

VINÍCIUS ROCHA LIMA SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Pogostemon cablin CONTRA *Klebsiella pneumoniae*

Trabalho de Conclusão do Curso (TCC)
apresentado no Curso de Odontologia da
Universidade Federal de Campina Grande –
UFCG como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de
Oliveira Filho

Coorientador: Prof^ª. Dra. Raline Mendonça
dos Anjos

PATOS/PB
2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado Bibliotecas – SISTEMOTECA/UFMG

S237a

Santos, Vinícius Rocha Lima

Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Pogostemon cablin* contra *Klebsiella pneumoniae* / Vinícius Rocha Lima Santos. – Patos, 2023.

26f.

Orientador: Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Coorientadora: Raline Mendonça dos Anjos.

Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Unidade Acadêmica de Odontologia.

1. Microbiologia. 2. Odontologia. 3. Fitoterapia. I. Oliveira Filho, Abrahão Alves de, *orient.* II. Título.

CDU 616.314:633.88

VINÍCIUS ROCHA LIMA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Pogostemon cablin CONTRA *Klebsiella pneumoniae***

Trabalho de Conclusão do Curso (TCC) apresentado no Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

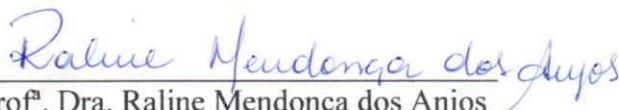
Coorientador: Prof^a. Dra. Raline Mendonça dos Anjos

Aprovado em : 23/09/2023

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Campina Grande



Prof^a. Dra. Raline Mendonça dos Anjos
Universidade Federal de Campina Grande



Prof^a Mestra Ana Karina Almeida Rolim
Universidade Federal de Campina Grande



Prof^a Dra. Elizandra Silva da Penha
Universidade Federal de Campina Grande

RESUMO

A *Klebsiella pneumoniae* é um exemplo de microorganismo não pertencente ao biofilme oral em estado de saúde, mas se torna presente em quadros de infecção, principalmente infecções nosocomiais. A alta virulência e resistência dessa bactéria a diversas formas de tratamento antimicrobiano representa uma grande preocupação no ambiente hospitalar, sendo assim é de extrema importância a busca por novos medicamentos que sejam eficazes no tratamento da infecção causada por essa bactéria. Óleos essenciais são uma alternativa viável para estudos pois apresentam consideráveis atividades terapêuticas em tratamentos antimicrobianos, um bom exemplo é o óleo de *Pogostemon cablin* que possui atividades antimicrobiana, antiaderente, anti inflamatória, dentre outras. O objetivo dessa pesquisa foi analisar o possível potencial antimicrobiano do óleo essencial extraído do *Pogostemon cablin* contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae*, por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que foi determinada pela técnica de microdiluição em placas contendo 96 orifícios estéreis com controle positivo, o antimicrobiano cloranfenicol. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi lida 48 horas após a CIM. Após a leitura verificou-se que o óleo essencial de *Pogostemon cablin* apresentou CIM 50% de 512 µg/mL contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae* testadas demonstrando um forte efeito antibacteriano, já na CBM os valores foram acima de 1024µg/mL caracterizando o óleo como uma substância bacteriostática. Portanto, foi possível observar-se o potencial antibacteriano do óleo essencial de *Pogostemon cablin* contra as cepas de *K. pneumoniae* testadas.

Palavras-chave: Fitoterapia; Microbiologia; Odontologia.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is an example of a microorganism that does not belong to the oral biofilm in a state of health, but is present in cases of infection, especially nosocomial infections. The high virulence and resistance of this bacterium to various forms of antimicrobial treatment represents a major concern in the hospital environment, so the search for new drugs that are effective in treating the infection caused by this bacterium is extremely important. Essential oils are a viable alternative for studies because they have considerable therapeutic activities in antimicrobial treatments. A good example is *Pogostemon cablin* oil, which has antimicrobial, anti-adherent and anti-inflammatory activities, among others. The aim of this research was to analyze the possible antimicrobial potential of the essential oil extracted from *Pogostemon cablin* against strains of *Klebsiella pneumoniae*, using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), which was determined using the microdilution technique in plates containing 96 sterile holes with a positive control, the antimicrobial chloramphenicol. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was read 48 hours after the MIC. After the reading, it was found that the essential oil of *Pogostemon cablin* presented a 50% MIC of 512 µg/mL against the *Klebsiella pneumoniae* strains tested, demonstrating a strong antibacterial effect, while the MBC values were above 1024 µg/mL, characterizing the oil as a bacteriostatic substance. Therefore, it was possible to observe the antibacterial potential of *Pogostemon cablin* essential oil against the *K. pneumoniae* strains tested.

Keywords: Phytotherapy; Microbiology; Dentistry.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a professor Abrahão por toda sua disponibilidade e bondade, bem como por todas as oportunidades que a mim foram dadas, participar da Liga Acadêmica de Fitoterapia, Bioquímica e Microbiologia (LAFBIM), fazer parte do projeto de extensão “Fitoterapia e COVID-19: Mitos e verdades”, e também por ser o melhor orientador que eu poderia ter durante todo a produção do meu trabalho de conclusão do curso, obrigado pelo seu compromisso com todos nós que tivemos o privilégio de trabalhar com o senhor, obrigado pela paciência e pelo seu jeito descontraído de ser.

Gostaria de agradecer à professora Raline que desde o 1º período foi uma grande inspiração, sempre admirei sua forma de ensinar e de transmitir conhecimento nas aulas, ser seu monitor de biofísica no 2º semestre foi uma experiência enriquecedora e é uma honra tê-la em como minha orientadora.

Gostaria de agradecer a professora Elizandra por todo seu carinho e cuidado com todos os alunos em clínica, principalmente na disciplina de clínica infantil, que definitivamente não foi uma disciplina fácil para mim.

Gostaria de agradecer a professora Karina por todo seu carisma e pelo seu jeito humano de tratar nós alunos, não é surpresa pra ninguém o porquê de você em tão pouco tempo ter cativado tantos de nós, é uma honra não apenas tê-la como professora homenageada por minha turma, mas especialmente por tê-la presente na minha banca.

Nos últimos dois anos da graduação me encontrei no vôlei, jogando todas as segundas, quartas e sextas na UFCG e em qualquer outra oportunidade que aparecesse, agradeço a amizade e ajuda de todos do vôlei da UFCG em especial a Renato, Gaby, Mariana, Karla, Thais, Alina, Lili, Lara, Pedro, Daniel, Jeza, Lucas, agradeço a Elias por toda paciência, principalmente nos primeiros treinos quando meu vôlei era nulo, também agradeço a todos do time masculino, graças á todos do vôlei UFCG minha despedida de Patos se tornou muito mais difícil, pois com vocês tive momentos incríveis e sentirei muita falta de tê-los em minha rotina.

Gostaria de agradecer ao meu amigo Marcos Antônio, com quem passei boa parte do período de quarentena jogando Mobile Legends e falando sobre música, filmes, jogos, tudo virtualmente, nossa amizade é o motivo pelo qual eu não enlouqueci durante a pandemia.

Gostaria de agradecer meu primo Fellipe, que por 4 meses dividiu comigo o mesmo teto, e em breve dividiremos a mesma profissão, o apartamento ficou grande demais pra mim depois de sua partida, sou grato por todo companheirismo e acima de tudo pelas amizades que

você me deu de presente, Piettra, Vitória, Cleiton, Sonaly, Aryelly, João Miguel, Juliana e muitos outros.

Gostaria de agradecer a todos da turma XIX que nunca me negaram ajuda quando necessário, seja um material, um conselho ou até mesmo um comentário depreciativo sobre desafetos em comum pra melhorar meu dia, em especial Ozanna, Iano, Samara e Ana Beatriz que chegou quase no final mas que teve uma importância muito grande, sua presença alegrou muito meus dias.

Gostaria de agradecer aos meus meninos André e Fabrício dos quais dividi muito mais do que atendimentos, vocês acrescentaram muito na minha experiência aqui, tenho muita admiração e carinho por vocês.

Dentre vários círculos, um em especial me parte o coração de pensar que não os terei comigo todo dia, Vitória, Glediston, Edla e Cecília vocês me ensinaram o verdadeiro significado de amizade, mesmo que tudo tivesse dado errado (o que de fato muitas vezes deu) ainda sim estar aqui teria valido a pena, por cada momento que tive com cada um de vocês, cada risada, cada piada, cada fofoca, nunca serei capaz de mostrá-los o quão grato sou por cada um de vocês, não consigo listar momentos por que são simplesmente muitos e nenhum me vem à mente pois todos foram igualmente importantes pra mim.

Gostaria de agradecer especialmente a minha grande amiga Roberta, cuja presença foi sem dúvidas essencial para que eu conseguisse superar todas as dificuldades que eu enfrentei, chega a ser estranho como nós às vezes sabemos exatamente o que se passa na cabeça um do outro, agradeço cada gesto de confiança e cuidado, você foi mais do que uma amiga, hoje tenho você como irmã.

Por fim gostaria de agradecer a minha família, mas antes quero pedir perdão, pela distância, por sempre me achar muito independente, pelas várias vezes que fui impaciente e insensível, sei que desde pequeno sempre fui diferente, e que lidar comigo foi um desafio muito grande, por isso hoje sou grato por todo o apoio de vocês, sou grato por minha tia Gracilene e minhas primas Maria e Kamilla por sempre ter sido um porto seguro onde eu podia ser eu mesmo, sou grato à minha avó Gracilene por cada conselho, à minha mãe Elizangêla por sempre sacrificar tudo por mim, e a meu pai Diassis por cada dia que ele se levantou antes do sol nascer pra que nunca me faltasse nada.

Por fim gostaria de agradecer ao Vinícius de anos atrás, por desde os 6 anos acordar de 5:30 todos os dias, do 4º ano fundamental até o último dia do ensino médio, pra estudar em Campina Grande, por sempre ter me esforçado, mesmo nunca sendo o melhor aluno da turma, mesmo nunca se destacando pelas melhores notas, mas por que eu sabia que era isso

que ia me levar bem longe um dia, por desde de muito pequeno ter entendido o próprio valor, por nunca ter deixado que a opinião e o preconceito das pessoas fizesse me sentir menos digno do que sou, e por sempre ter uma resposta na ponta lingua toda vez que fui repreendido por isso, seja por um desconhecido ou até mesmo de por alguém da própria família, por nunca ter tido medo de ficar sozinho no mundo, muitos me perguntavam se eu não tinha medo, medo de sair do conforto de casa aos 17 anos pra viver sem pai nem mãe, numa cidade desconhecida, e a resposta sempre foi a mesma, não, nunca tive medo, pelo contrario eu nunca desejei algo tanto quanto isso, logo sou imensamente grato a todas as oportunidades e ensinamentos que a vida me proporcionou durante todos os anos de graduação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Concentração mínima inibitória (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do Óleo essencial de *Pogostemon Cablin* contra diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Tabela 02 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) em $\mu\text{g/mL}$ do Óleo essencial de *Pogostemon Cablin* contra diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABPA	Aspergilose broncopulmonar alérgica
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
<i>C. tropical</i>	<i>Candida tropical</i>
CIM	Determinar a Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Kp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
PAC	Pneumonia adquirida na comunidade
<i>P. cablin.</i>	<i>Pogostemon cablin</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UTIs	Unidade de tratamento intensivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. GERAL.....	13
2.2. ESPECÍFICOS.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
4. METODOLOGIA E VIABILIDADE.....	18
4.1. SUBSTÂNCIAS-TESTE.....	18
4.2. ESPÉCIES BACTERIANAS E MEIO DE CULTURA.....	18
4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	18
4.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1. RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	20
5.2. RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	21
6. CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

A microbiota presente na cavidade oral é a segunda mais diversificada do corpo humano, contendo mais de 700 espécies bacterianas, a maioria delas mantendo uma relação de simbiose com o organismo (Kilian *et al.*, 2016). A cavidade oral humana é um ambiente bastante complexo que abriga diversas substâncias e microrganismos, e a organização destes em comunidades envolvidas por uma matriz de polissacarídeos contendo ácidos nucleicos, proteínas e água forma o biofilme, que, por sua vez, se encontra aderido aos dentes, estruturas restauradoras dentárias e tecidos moles da cavidade oral (Souza *et al.*, 2016)

Cada microrganismo presente no biofilme possui características e funções individuais nessa estrutura, tanto que esse muitas vezes é comparado com organismos multicelulares, onde as células constituintes se diferenciam com funções especializadas e trabalham em conjunto para a sobrevivência da comunidade (Santos, 2022).

Cada milímetro cúbico de biofilme oral contém aproximadamente 100 milhões de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus. Sendo assim, o biofilme pode agir como reservatório de patógenos que posteriormente podem entrar na corrente sanguínea e/ou se manter presentes na saliva e serem aspirados, causando infecções em outros locais do corpo (Damascena *et al.*, 2017).

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* está presente no biofilme gastrointestinal, porém estudos apontam sua presença no biofilme oral em situações específicas, como a de pacientes hospitalizados, imunocomprometidos, em UTIs e sob uso de ventilação mecânica (Souza *et al.*, 2017; Vivas *et al.*, 2020). Bactérias pertencentes ao gênero *Klebsiella* são as principais causadoras de infecções hospitalares de alta morbidade e mortalidade, e a *Klebsiella pneumoniae* é a espécie de maior importância clínica, visto que pode causar infecções no sistema urinário, septicemia e a pneumonia nosocomial (Pereira, Vanetti, 2015). A pneumonia nosocomial é a segunda infecção nosocomial mais comum e a que causa mais mortes dentre as infecções nosocomiais, onde até metade dos acometidos podem vir a óbito (Oliveira *et al.*, 2007).

Um ponto muito importante sobre a *Klebsiella pneumoniae* é a sua alta resistência a diversos antibióticos, representando um dos patógenos mais preocupantes quando se trata de resistência bacteriana, o que causa um alerta não só no tratamento das infecções causadas por essa bactéria, como também no desenvolvimento de novos fármacos em especial de

substâncias oriundas de plantas medicinais que apresentem eficácia na ação antibacteriana contra esta bactéria (Vivas *et al.*, 2020; Navon-Venezia, Kondratyeva, Carattoli, 2017).

Dentro da fitoterapia há diversas alternativas para avaliação de efeito antibacteriano sendo uma delas os óleos essenciais, que nada mais são do que produtos naturais obtidos a partir do metabolismo secundário de plantas medicinais, atuando na reprodução da planta, atraindo animais polinizadores, como também na defesa da mesma. Tratam-se de líquidos, voláteis e lipofílicos, que podem ser encontrados nas flores, folhas, raízes, frutas, dentre outras partes da planta. Vários estudos voltados para esses óleos têm chamado atenção da indústria farmacêutica, uma vez que foi observado uma presença de atividades antimicrobiana, analgésica, anti inflamatória, dentre outras (Bakkali *et al.*, 2008).

Um exemplo de um óleo com grande potencial para estudos de avaliação de efeito antibacteriano é o óleo proveniente da *Pogostemon cablin* (Blanco), também conhecida como patchouli, que é uma erva aromática originária do sudeste da Ásia e é bastante cultivada em países como Indonésia, Filipinas, Malásia, China, e Brasil. Na China bem como nas regiões próximas ao país, a *P. cablin* é bastante popular no tratamento de resfriados, cefaleia, febre, vômito, indigestão e diarreia, além disso é bastante utilizada como agente antifúngico (Chen *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2015).

O óleo essencial extraído dessa planta é rico em terpenos, tendo o patchoulol como seu principal constituinte. Estudos apontam que esse óleo possui propriedades: antimicrobianas, antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatórias, antimutagênicas, antitrombóticas, antieméticas e citotóxicas. Na literatura não há relatos de estudos que avaliem a ação antibacteriana desse óleo essencial contra a *K. pneumoniae*, porém é possível encontrar pesquisas que comprovaram que o extrato etanólico da *P. cablin* tem ação inibitória e antimicrobiana moderada contra diversas espécies responsáveis por infecções nosocomiais, como por exemplo *Staphylococcus aureus*, MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e *Streptococcus pyogenes* (Dechayont *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Pogostemon cablin* contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial frente às diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*;
- Verificar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de *Pogostemon cablin* frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O biofilme se trata de uma comunidade organizada de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus, dentro de uma matriz de polissacarídeos com ácidos nucleicos, proteínas e água. A formação do biofilme oral é um processo gradativo que acontece em quatro etapas principais: formação da película adquirida, colonização primária (precoce), colonização/coagregação secundária e estabelecimento de biofilme maduro. Essas comunidades são constantemente influenciadas pelo ambiente na qual elas se desenvolvem, a exemplo da cavidade oral, o biofilme oral interage intimamente com a saliva, alimentos que consumimos, descamação epitelial, além de se beneficiar de nichos e locais de retenção. A microbiota oral também sofre alterações de acordo com o pH e disponibilidade de oxigênio, favorecendo o crescimento de determinadas formas de vida em detrimento de outras de acordo com essas modificações (Damascena *et al.*, 2017; Sousa *et al.*, 2016).

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria gram-negativa encapsulada presente nas superfícies mucosas de mamíferos e no ambiente (água, solo, dentre outros). Em seres humanos saudáveis ela não coloniza a microbiota oral e orofaríngea, sendo mais comumente encontrada no trato gastrointestinal, porém em algumas situações esta se faz presente no biofilme oral e orofaríngeo de onde pode entrar circulação ou ser aspirada entrando em contato com outros tecidos e ocasionando infecções (Piperaki *et al.*, 2017).

Na era pré-antibiótica era uma importante causa de pneumonia adquirida na comunidade, especialmente entre alcoólatras e diabéticos, já na era dos antibióticos ela se estabeleceu como um dos principais patógenos causadores de infecções hospitalares, em pacientes intubados, em casos de precariedade de saneamento básico, em idosos em casas de repouso, pacientes internados em UTIs. Além de ser causa de sepse e meningite em recém-nascidos prematuros e lactentes, bem como infecções graves em crianças imunocomprometidas e desnutridas. Já na comunidade, *K. pneumoniae* é causa de infecções no trato urinário entre crianças imunocompetentes (Piperaki *et al.*, 2017).

A *K. pneumoniae* possui uma alta taxa de alta virulência e patogenicidade que é garantida pelas características da cápsula polissacarídica da membrana externa, a produção de sideróforos (captação de ferro do ambiente), hemolisina (citotoxina hemolítica, com efeito dermonecróticos e neurotóxicos), fosfolipase, adesinas fimbriais e de polissacarídeo capsular (responsável pelo aspecto mucóide das colônias) (Benite, Machado, Machado, 2002; Da Silva, 2012; Pereira, Vanetti, 2015).

O percentual total do grupo de bactérias causadoras de infecções nosocomiais

(incluindo a *K. pneumoniae*) na cavidade oral de pacientes infectado pode chegar a 70% no biofilme dental, 63% no biofilme lingual e 73% no tubo do respirador artificial (Oliveira *et al.*, 2007). A infecção hospitalar mais grave envolvendo a *K. pneumoniae* é a pneumonia nosocomial (Pereira, Vanetti, 2015).

A pneumonia se trata de uma infecção debilitante, causada por inúmeros agentes infecciosos, como por exemplo micoplasmas, parasitas, vírus, fungos e bactérias. É um processo infeccioso e inflamatório agudo que se localiza nos pulmões, mais especificamente no parênquima pulmonar. Os alvéolos, os brônquios respiratórios e interstícios também são afetados, além de haver formação de exsudato inflamatório aparentemente purulento, reduzindo a função respiratória do paciente, causando a insuficiência respiratória resultando na sensação dolorosa torácica e de fadiga (Spezzia, 2019).

Os casos de pneumonia são classificados de acordo com o local de contágio e etiologia em pneumonia nosocomial ou hospitalar e em pneumonia adquirida na comunidade (PAC). A pneumonia nosocomial se instala após 48 a 72 horas de internação do paciente, não sendo causada por patógenos adquiridos previamente à admissão no ambiente hospitalar. Também inclui-se a esse grupo a pneumonia associada à ventilação mecânica, que se instala após 48 horas de intubação. Já a PAC se inicia fora do ambiente hospitalar (De Lima, De Araujo, 2011).

A pneumonia nosocomial é responsável por 10% a 15% de todas as infecções nosocomiais. Alguns estudos apontam que 20% a 50% dos pacientes que adquirem essa infecção vão a óbito, outros atribuem valores ainda maiores de 40% a 70%, e o risco de desenvolvimento dessa infecção é 10 a 20 vezes maior em UTIs, além disso seu desenvolvimento em pacientes que se encontram em ventilação mecânica e/ou umidificador, que pode variar entre 7% a 40% (Boszczowski *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2007).

A negligência por parte dos cirurgiões-dentistas e da equipe de enfermagem em relação a higienização oral de pacientes hospitalizados, em UTIs e intubados é uma das principais causas de infecções nosocomiais, uma vez que o biofilme desses pacientes age como um reservatório de microrganismos e patógenos (Cordeiro *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2013; Vilela *et al.*, 2015). Como também o fato de que o biofilme geralmente é transparente ou sem cor, dificultando assim sua remoção e higienização da cavidade oral desses pacientes (Andrade *et al.*, 2021). Além da má higienização existe também o ressecamento da mucosa e a xerostomia causadas pelo aumento da respiração bucal em pacientes com complicações respiratórias, agravando as infecções bacterianas e fúngicas bucais (De Luca *et al.*, 2017).

A multirresistência aos antibióticos utilizados na terapia é um dos principais problemas

enfrentados no controle de *K. pneumoniae*, sua capacidade de formar biofilme, que o protege do sistema imune do hospedeiro e da ação dos antimicrobianos, confere a essa bactéria uma multirresistência e a fácil disseminação, principalmente em epitélio e em tecidos e superfícies de instrumentos hospitalares.

Um estudo realizado com urocultura de idosos que residem numa casa de longa permanência demonstrou que algumas cepas de *K. pneumoniae* demonstraram resistência à amoxicilina associada a ácido clavulânico, em 62,5% das culturas onde foram administrada essa substância, piperacilina associada a tazobactam, em 37,5% das culturas, e a carbapenêmicos, em 25% das culturas. (Silva *et al.*, 2022).

Um estudo realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em São Paulo mostrou que durante o período de pandemia houve um considerável aumento de cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes em comparação com o período pré-pandêmico. Em relação aos carbapenêmicos, apresentou-se o valor de 22 amostras positivas para *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem/1000 pacientes/dia durante a pandemia em comparação com 15,1 amostras positivas para *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem/1000 pacientes/dia antes da pandemia. Esse fenômeno se repetiu de forma ainda mais grave com a polimixina B, que se mostrou menos eficaz contra a *K. pneumoniae*, o aumento de cepas resistentes foi de quase 50%, de 18,5 amostras positivas para *Klebsiella pneumoniae* resistente à polimixina B/1.000 pacientes/dia pré-pandemia para 26,6 amostras positivas para *Klebsiella pneumoniae* resistente à polimixina B/1000 paciente/dia durante a pandemia (Gaspar *et al.*, 2021).

Durante o período de 17 de Março até 27 de Maio de 2020, Costa *et al.* (2022) avaliou a presença de bactérias multirresistentes em pacientes diagnosticados com COVID-19 internados em um hospital privado do sudeste brasileiro. A *K. pneumoniae* estava presente em 14 de 57 pacientes com COVID-19 que adquiriram alguma infecção após sua internação, dentre os 14 pacientes 8 deles apresentaram *K. pneumoniae* com multirresistência, 3 apresentaram uma variante da bactéria que possuía um maior espectro de beta-lactamases, e 1 paciente possuía uma variante resistente a carbapenêmicos.

Atualmente é de extrema importância a busca por novas formas de controle e tratamento contra a *K. Pneumoniae*, e os produtos de origem natural são uma possibilidade de tratamento fácil e barata em diversas infecções bacterianas similares às causadas pela *K. Pneumoniae* (Bachi, 2017; Pieniz *et al.*, 2018).

Pogostemon cablin, também conhecida como patchouli, é um membro da família *Lamiaceae* de plantas com flores, bastante popular no sudeste da Ásia e toda região próxima

ao país, como também em várias outras regiões tropicais e subtropicais como Filipinas, Indonésia e Tailândia, é bastante usada em perfumaria e aromaterapia, bem como para tratar resfriados, náuseas, febre, dor de cabeça e diarreia. A planta também está entre as matérias-primas utilizadas em formulações de vários medicamentos chineses patenteados. O óleo extraído dessa planta possui efeito antimicrobiano, antioxidante, analgésico, anti-inflamatório, antimutagênico, antiviral, antitrombótico e antiemético, além de auxiliar na cicatrização e perda de peso (Dechayont *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2020; Juren *et al.*, 2021).

Os principais componentes do óleo essencial da *P. cablin* são o patchoulol, pogostone, α -guaïeno, δ -guaïeno, β -cariofileno, trans-cariofileno, α -patchouleno, β -patchouleno e β -elemeno. Os terpenos, mais precisamente os sesquiterpenos, são responsáveis por uma grande proporção do óleo e o conteúdo de patchoulol é o mais alto entre todos os ingredientes (Juren *et al.*, 2021).

Os terpenos se tratam de metabólitos secundários naturais encontrados em diversas plantas, são os principais componentes dos óleos essenciais e são responsáveis por diversas funções fisiológicas, dentre elas o mecanismo de defesa das plantas contra os herbívoros e patógenos. Terpenos são compostos por uma unidade de isopreno (C_5H_8) e possuem propriedades biológicas como por exemplo: anticonvulsivante, antileishmanial, antiinflamatória, sedativa, antinociceptiva e antimicrobiana (Lima, 2018; Vieira *et al.*, 2018). A atividade antibacteriana do óleo essencial de *P. cablin* é atribuída principalmente aos α -patchouleno, patchoulol e pogostone, onde os dois últimos apresentam potencial contra membranas de parede celular de bactérias através de ancoragem molecular (docking molecular) (Dechayont *et al.*, 2017).

Em um estudo que tinha como objetivo registrar atividade antimicrobiana de óleos essenciais contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*, patógenos causadores e um grande número de infecções nosocomiais, o óleo extraído da *P. cablin* mostrou valores de atividade inibitória e antibacteriana superiores ao do controle demonstrado pela amoxicilina nas espécies de bactérias testadas. No entanto, não há nenhum registro de estudos sobre a atividade antimicrobiana da *P. cablin* contra a *K. pneumoniae*, sendo esse o objetivo principal desta pesquisa (Bachi, 2017; Pieniz *et al.*, 2018).

4. METODOLOGIA E VIABILIDADE

4.1 SUBSTÂNCIAS-TESTE

O óleo essencial do *Pogostemon cablin* foi adquirido da Indústria Harmonie Aromaterapia® (Florianópolis - SC). Para a realização dos ensaios farmacológicos, a substância foi solubilizada em DMSO (dimetilsulfóxido) e diluído em água destilada. A concentração de DMSO utilizada foi inferior a 0,1% v/v. A pesquisa seguiu as normas do CGEN - Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, cadastrado na plataforma SISGEN sob o número de protocolo A4F2097.

4.2 ESPÉCIES BACTERIANAS E MEIO DE CULTURA

Foram utilizadas as seguintes cepas de *Klebsiella pneumoniae*: ATCC 13883, Kp 101, Kp 102, Kp 103, Kp 104, Kp 105. As cepas foram mantidas em meio Ágar Muller Hinton (AMH) a uma temperatura de 4 °C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em AMH incubados a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana foi utilizado um inóculo bacteriano de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (Cleeland, Squires, 1991; Hadacek, Greger, 2000; Bona, *et al.* 2014).

4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM foi determinada utilizando a técnica de microdiluição em placa de 96 poços com fundo em “U”. Em uma placa de 96 cavidades, foram adicionados 100 µl caldo Mueller Hinton, duplamente concentrado, e 100 µl do óleo essencial de *Pogostemon cablin*, nas concentrações de 1024 a 16 µg/mL. A determinação da CIM foi conduzida com 10 µl do microrganismo em cada cavidade, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. O penúltimo contendo 200 µl do caldo foi inoculado com a suspensão de microrganismo, sendo o controle do crescimento, e o último poço recebeu apenas 200 µl do caldo, sendo o controle negativo. O ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. Após o tempo de incubação adequado dos ensaios com as bactérias, foi realizada a primeira leitura dos resultados. Em seguida, foram adicionados 20 µl de solução de resazurina sódica (SIGMA), em água destilada esterilizada na concentração de 0,01 % (p/v), reconhecido como

indicador colorimétrico de óxido-redução para bactérias. A leitura se procedeu, visualmente, pela ausência ou presença de crescimento do microrganismo pela formação de aglomerado de células (botão). E também pela observação da mudança da coloração da solução, de azul para rosa, indicando crescimento do mesmo. Foi feita uma nova incubação a 37 °C. A CIM foi determinada como a menor concentração do óleo essencial que inibiu o crescimento visível do microrganismo e também pela observação da mudança da coloração da solução, de azul para rosa, indicando crescimento do microrganismo (Bona, *et al.* 2014; Clsi 2012; Ostrosky, *et al.* 2008; Palomino *et al.*, 2002).

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A concentração bactericida mínima (CBM) do óleo também foi determinada para as cepas de bactérias. Após a leitura da CIM em 24 horas, alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço da placa de microtitulação que não apresentaram crescimento bacteriano e transferidas para poços de uma nova placa de microtitulação contendo 100 µL de caldo Muller Hinton, desprovidas de qualquer antimicrobiano. As placas inoculadas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C, e as CBMs foram registradas após 48 h. A CBM foi definida como a menor concentração do óleo essencial que resultou em inibição visível do crescimento do micro-organismo. (Guerra, *et al.* 2012; Ncube, Afolayan, Okoh, 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A avaliação da CIM do óleo essencial demonstrou um valor de CIM 50% de 512 µg/mL, ou seja essa foi a concentração que obteve efeito antibacteriano em pelo menos 50% das cepas, conforme a tabela 01.

Tabela 01 - Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL do Óleo essencial de *Pogostemon Cablin* contra diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

	KP ATCC	KP 101	KP 102	KP 103	KP 104	KP 105
1024 µg/mL	+	+	+	+	+	*
512 µg/mL	-	+	+	+	+	*
256 µg/mL	-	-	-	-	+	*
128 µg/mL	-	-	-	-	-	*
64 µg/mL	-	-	-	-	-	*
32 µg/mL	-	-	-	-	-	*
16 µg/mL	-	-	-	-	-	*
8 µg/mL	-	-	-	-	-	*
4 µg/mL	-	-	-	-	-	*
Controle de esterilidade	-	-	-	-	-	*
Controle de crescimento	+	+	+	+	+	+

(+) Inibição (-) Sem inibição (*) maior que 1042 µg/mL

Levando em consideração a escala de Sartoratto *et al.*, (2004) onde a ação inibitória dos óleos é classificada como forte com valores até 500µg/mL, moderada entre 600 e 1500µg/mL e fraca acima de 1500µg/mL, com base nessa afirmação observa-se que o óleo apresentou forte efeito antibacteriano.

Outros estudos sobre o mesmo óleo corroboram com o efeito antibacteriano do mesmo, por exemplo o estudo de Das *et al.* (2013) que demonstrou efeito inibitório forte contra cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae* e *Escherichia coli*. O mesmo estudo também testou o efeito inibitório do óleo contra espécies de fungos, onde o óleo apresentou forte ação inibitória contra *Aspergillus fumigatus*, espécie de fungo causador da aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) (Latgé,

Chamilos, 2019).

O estudo de Beşirik e Göger (2023) avaliou o efeito do óleo essencial de *Pogostemon cablin* associado a antibióticos. Foi possível observar que o óleo potencializou o efeito da cefuroxima e da claritromicina contra *S. aureus* e *E. coli*. Também foi avaliada a combinação do óleo essencial com antifúngicos, onde houve um efeito potencializador do fluconazol contra *C. albicans* e *C. tropical*, já a combinação com terbinafina obteve resultados positivos apenas contra *C. tropical*.

5.2 RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Com relação a CBM o óleo apresentou valores acima da concentração de 1024 µg/mL. conforme a tabela 02.

Tabela 02 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) em µg/mL do Óleo essencial de *Pogostemon Cablin* contra diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*

	KP ATCC	KP 101	KP 102	KP 103	KP 104
1024 µg/mL	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-	-

Legenda:

(+) Inibição (-) Sem inibição

Para um composto ser considerado bactericida ele precisa obter um valor de CBM que seja o dobro ou igual ao valor de sua CIM, caso o valor de CBM seja maior que o dobro da CIM ele é caracterizado como uma substância bacteriostática (Hafidh, *et al.* 2011). Sendo assim, o óleo essencial de *Pogostemon cablin* apresentou efeito bacteriostático contra as cepas testadas. Porém, no estudo de Das *et al.* (2013) o óleo apresentou efeito bactericida contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*.

Atualmente existem poucos estudo *in vivo* tendo esse óleo como substância teste, porém no estudo de Wan *et al.* 2021 onde foi testado o potencial antimicrobiano *in vitro* e *in vivo* do álcool *patchouli*, um composto isolado do óleo essencial de *Pogostemon cablin*, o mesmo apresentou grande ação protetora contra MRSA, com taxa de sobrevivência de 100% das cobaias nas concentrações de 100 e 200 mg/kg.

6. CONCLUSÃO

Portanto, a partir dos dados obtidos, observou-se que dentro da metodologia utilizada o óleo essencial de *Pogostemon cablin* apresenta um efeito bacteriostático forte contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae* testadas, todavia ele não apresentou efeito bactericida para as mesmas, mais estudos são necessários para avaliar esse potencial, por exemplo estudos *in vivo* e estudos abordando sua ação associada a outros agentes antibacterianos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Sérgio Araújo *et al.* Uso da fluorescência óptica de campo amplo para visualização de biofilme oral em paciente com mucosite peri-implantar: uma nova abordagem. **Einstein (São Paulo)**, v. 19, 2021.
- BACHI, Alex Júnior. **Avaliação antimicrobiana de óleos essenciais e sua capacidade antioxidante em ensaios in vitro**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- BAKKALI, Fadil *et al.* Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BENITE, Anna Maria Canavarro; MACHADO, Sérgio de Paula; MACHADO, Bianca da Cunha. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1155-1164, 2002.
- BEŞIRIK, Nazlı Şenay; GÖGER, Gamze. Antimicrobial evaluation of the Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) leaf essential oil combination with standard antimicrobial compounds. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 10, n. 3, p. 385-393, 2023
- BONA, Eliana Almeida Mira De *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218-225, 2014.
- BOSZCZOWSKI, Icaro *et al.* *Klebsiella pneumoniae* multirresistente: diversidade genética, mecanismos de resistência às polimixinas e desfechos clínicos em um hospital universitário terciário no Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, 2019.
- CHEN, Ying *et al.* Acúmulo dinâmico de sesquiterpenos em óleo essencial de *Pogostemon cablin*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 626-634, 2014.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiotics in Laboratory Medicine. New York: Willians & Wilkins**, p. 739-788, 1991.
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- CORDEIRO, Luana Clementino *et al.* A Importância Da Instalação De Um Protocolo De Higiene Oral Em Pacientes Entubados Revisão De Literatura. **Revista Fluminense de Odontologia**, p. 112-123, 2022.
- COSTA, Rafael Lessa da *et al.* Secondary infections in a cohort of patients with COVID-19 admitted to an intensive care unit: impact of gram-negative bacterial resistance. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, 2022.

DAMASCENA, Leticia Cristina Leite *et al.* Fatores associados ao biofilme oral em pacientes internados em UTI com doenças infecciosas. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 46, p. 343-350, 2017.

DAS, Puspa *et al.* Antibacterial and antifungal activity analysis of essential oil of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v. 30, n. 1-2, p. 7-10, 2013

DA SILVA, Elizabete Rodrigues. Produção de hemolisinas por *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina subclínica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 2, p. 118-123, 2012.

DECHAYONT, Bhanuz *et al.* Atividades antioxidantes e antimicrobianas de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. **Journal of Botany**, 2017.

DE LIMA GADELHA, Raissa; DE ARAÚJO, Júlio Maciel Santos. Relação entre a presença de microorganismos patogênicos respiratórios no biofilme dental e pneumonia nosocomial em pacientes em unidade de terapia intensiva: Revisão de Literatura. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 2, n. 1, p. 95-104, 2011.

DE LUCA, Fernando Augusto *et al.* A importância do cirurgião-dentista e a proposta de um protocolo operacional padrão-pop odontológico para UTIs. **Uningá Journal**, v. 51, n. 3, 2017.

GASPAR, Gilberto Gambero *et al.* Pre-and post-COVID-19 evaluation of antimicrobial susceptibility for healthcare-associated infections in the intensive care unit of a tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2021.

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

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

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

HONG, Seong Jun *et al.* Inhalation of patchouli (*Pogostemon Cablin* Benth.) essential oil improved metabolic parameters in obesity-induced Sprague Dawley rats. **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 2077, 2020.

JUNREN, Chen *et al.* Pharmacological activities and mechanisms of action of *Pogostemon cablin* Benth: a review. **Chinese medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-20, 2021.

KILIAN, Mogens *et al.* The oral microbiome—an update for oral healthcare professionals. **British dental journal**, v. 221, n. 10, p. 657-666, 2016

LATGÉ, Jean-Paul; CHAMILOS, Georgios. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 1, p. 10.1128/cmr.00140-18, 2019.

LIMA, Raissa Ximenes. **Atividade antimicrobiana de terpenos e antibióticos convencionais e suas associações frente klebsiella pneumoniae produtoras de carbapenemase**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

NAVON-VENEZIA, Shiri; KONDRATYEVA, Kira; CARATTOLI, Alessandra. *Klebsiella pneumoniae*: uma importante fonte mundial e transporte para resistência a antibióticos. **Revisões de microbiologia FEMS**, v. 41, n. 3, pág. 252-275, 2017.

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

OLIVEIRA, Luiz Cláudio Borges Silva de *et al.* Presença de patógenos respiratórios no biofilme bucal de pacientes com pneumonia nosocomial. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, pág. 428-433, 2007.

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

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTALES, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.2720-2722, 2002.

PEREIRA, SCL; VANETTI, MCD Virulência potencial de *Klebsiella* sp. isolados de dietas enterais. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 48, p. 782-789, 2015.

PIENIZ, S. *et al.* Molecular identification and microbiological evaluation of isolates from equipments and food contact surfaces in a hospital Food and Nutrition Unit. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, p. 191-200, 2018.

PIPERAKI, Evangelia-Theophano *et al.* *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 10, p. 1002-1005, 2017.

RIBEIRO, Aurislaine Santos *et al.* Intensidades de luz alteram o crescimento e óleo essencial de patchouli sob telas de sombra. **Ciência Rural** v. 52, 2021.

SANTOS, Paulo Sérgio da Silva *et al.* Impacto da remoção de biofilme lingual em pacientes sob ventilação mecânica. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 25, p. 44-48, 2013.

SANTOS, André Luis Souza dos. Cientistas brasileiros: muito a aprender com o estilo de vida do biofilme microbiano (uma organização resistente, resiliente, bem orquestrada e dinâmica). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 27, p. 947-950, 2022.

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

SILVA, João Luis Almeida da *et al.* Resistência microbiana a medicamentos em uma Instituição de Longa Permanência para Idosos. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 35, 2022.

SOUZA, Júlio *et al.* Formação de biofilme em diferentes materiais utilizados na reabilitação oral. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 27, p. 1-147, 2016.

SOUZA, Luana Carneiro Diniz *et al.* Association between pathogens from tracheal aspirate and oral biofilm of patients on mechanical ventilation. **Brazilian Oral Research**, v. 31, 2017.

SPEZZIA, Sérgio. Pneumonia nosocomial, biofilme dentário e doenças periodontais. **Braz J Periodontol**, v. 29, n. 2, p. 65-72, 2019.

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

VILELA, Maria Carolina Nunes *et al.* Cuidados bucais e pneumonia nosocomial: uma revisão sistemática. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, p. 290-296, 2015.

VIVAS, Roberto *et al.* Prevalência de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase e *K. pneumoniae* metalo-beta-lactamase de Nova Deli em Sergipe, Brasil, e terapia combinada como uma potencial opção de tratamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

WAN, Feng *et al.* In vitro and in vivo antibacterial activity of *patchouli* alcohol from *Pogostemon cablin*. **Chinese journal of integrative medicine**, v. 27, p. 125-130, 2021.

XU, Yan *et al.* Autotoxicidade em *Pogostemon cablin* e seus aleloquímicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 117-123, 2015.