

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CURSO DE BACHARELADO EM ODONTOLOGIA

LARA MAYANNE MOREIRA DE OLIVEIRA NÓBREGA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL
Gaultheria procumbens **CONTRA AS CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae***

PATOS – PB

2023

LARA MAYANNE MOREIRA DE OLIVEIRA NÓBREGA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL
Gaultheria procumbens CONTRA AS CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Co-orientadora: Profa. Dra. Raline Mendonça dos Anjos

PATOS – PB

2023

LARA MAYANNE MOREIRA DE OLIVEIRA NÓBREGA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Gaultheria procumbens CONTRA CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae***

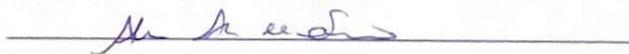
Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título Bacharel em Odontologia.

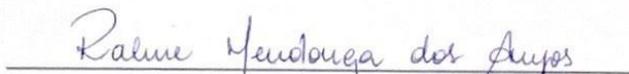
Orientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

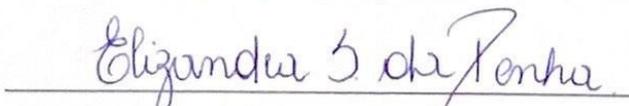
Co-orientadora: Profa. Dra. Raline Mendonça dos Anjos

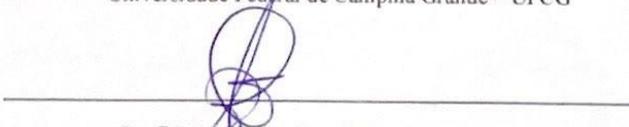
Aprovado em: 27/07/22

BANCA EXAMINADORA


Prof.^o Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho – Orientador
Universidade Federal De Campina Grande – UFCG


Prof.ª Dra. Raline Mendonça dos Anjos – Co-orientadora
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG


Prof.ª Dra. Elizandra Silva da Penha – 1º membro
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG


Prof.º Dr. Jerme Ferreira Rocha – 2º membro
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

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

N754s

Nóbrega, Lara Mayanne Moreira de Oliveira

Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial *Gaultheria procumbens* contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae* / Lara Mayanne Moreira de Oliveira Nóbrega. – Patos, 2023.
25f.

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. Farmacologia. 2. Fitoterapia. 3. Odontologia. 4. Oliveira Filho, Abrahão Alves de, *orient.* II. Título.

CDU 616.314:633.88

Primeiramente dedico a conclusão desse trabalho a Deus, que sempre está comigo em todas as adversidades da vida e nunca solta a minha mão. Além disso, ao meu pai e minha mãe, a minha avó materna, ao meu noivo, aos meus irmãos e a toda a minha família que sempre me apoiaram em toda minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, porque toda honra e toda a glória a Ele, se não fosse Ele eu não teria chegado até aqui, o tempo de Deus é bom, perfeito e agradável e a gente tem que confiar e entregar todos os nossos planos e objetivos ao senhor. Eu sempre sonhei em cursar odontologia, mas no meu primeiro enem, eu não passei, por pouco, e eu não queria ficar fazendo enem de novo, então eu passei pra biologia, e fui cursar, porque iria tentar transferência, e quando eu dizia isso as pessoas, elas diziam que não ia dá certo, ou de forma indireta diziam, transferência é tão difícil. Então tem um louvor que diz assim: “Quando eu contei os meus sonhos para alguém me disseram são grandes demais pra você, quando eu falei aonde eu queria chegar, me falaram pare por aqui não vá além, mas com Deus foi bem diferente, ele me disse vá enfrente eu contigo estou...”. E ele representa a minha história. Então Senhor obrigada, por tanto, por todo o cuidado que tem comigo, e por todo amor. Eu me lembro quando tudo isso era apenas oração, e hoje está tudo se tornando realidade.

Queria agradecer ao meu Pai Josimá, por sempre ter me ensinado o que era certo e errado, e o caminho que se deve andar, por ter me mostrado que nem tudo na vida é fácil, e que a gente tem que correr atrás dos nossos objetivos, com garra e determinação. Obrigada pai, por me ensinar a trabalhar e batalhar, para conquistar o que almejo, sempre com honestidade e integridade. O senhor é meu exemplo de homem íntegro, trabalhador, tenho muito amor e admiração.

Também queria agradecer a minha mãe Anne Karine, minha mãe a senhora sempre acreditou em mim, e em tudo que eu me propus a fazer, quando alguém me dizia que eu não iria conseguir a senhora dizia, tenha paciência minha filha, é tudo no tempo certo. Obrigada, por sempre ter me apoiado em qualquer decisão que tenha tomado na vida, e por dizer que estava sempre torcendo por mim. Eu te amo.

Queria agradecer a minha avó Maria Moreira, mais conhecida como Nilda, a senhora para mim, é exemplo de mulher guerreira e batalhadora, você é o meu grande amor, a sua história me inspira. Minha dodó como eu costumo chamar, largou tudo e veio morar comigo, para eu poder terminar o curso, a nossa família é de longe e ela só tem eu aqui, e mesmo assim só comigo aqui, ela deixou tudo e veio. Como diz ela, veio cuidar de mim, e como dizem vó é a segunda mãe, e o amor e cuidado de vó é diferente. Todo amor que ela tem por mim, é notado desde do primeiro bom dia, quando eu acordo e ela diz, filha o que você quer comer hoje, para eu fazer? Até o você demorou eu estava preocupada. Obrigada por tanto, se não fosse a senhora eu não estaria nem aqui. Amo você.

Agradeço ao meu noivo Hudson Kaio, você foi fundamental em toda essa trajetória, obrigada por me apoiar e sempre dizer que eu sou capaz, de me impulsionar nos meus sonhos. Kaio é uma pessoa muito importante na minha vida, porque ele é companheiro, conselheiro e amigo, ele segurou a minha mão em um dos momentos mais difíceis da minha vida, e disse que estava ali, e me fazia se sentir segura para enfrentar tudo que estava acontecendo. Obrigada por ser a minha pessoa no mundo, e por cuidar tão bem de mim. Obrigada por me inspirar na odontologia, e na vida, você fez parte desse sonho. Eu amo você.

Quero agradecer as minhas tias, Tia Jane que é como se fosse uma mãe pra mim, Tia Geila, Tia Lene, Tia Tita, sem vocês eu não teria chegado até aqui, obrigada por tanto amor, cuidado e carinho. Por me apoiarem, e me dar todo suporte necessário ao longo da minha graduação. Eu amo vocês, não sei o seria de mim, se não fosse vocês. Também não poderia esquecer, da minha tia Dó, que não está mais aqui entre nós, mas que fez parte e conseguiu acompanhar um pouco dessa trajetória, eternas saudades, da alegria que ela representava para nós. Vocês são a minha base, o meu alicerce.

A minha tia Aila, que é minha amiga, companheira e parceira. Obrigada por ter me acolhido quando eu mais precisei, e por ter cuidado de mim como filha. Não tenho palavras pra expressar a gratidão que eu tenho, por tudo que a senhora fez por mim, eu te amo tia .

Ao meu tio chiquinho, que também foi como se fosse um pai para mim. Chiquinho cuidava de mim como cuidava dos seus filhos, me levava e buscava na escola, dava o dinheiro do lanche e ainda deixava picolé pago todos os dias. É tanto amor e carinho, que eu só tenho eterna gratidão por tudo que fez por mim. Amo você.

Meu irmão Paulo Fernando, que sempre me apoiou e que quando eu precisava de um conselho, era ele que eu conversava, e ele me orientava, obrigada por ter me escutado, e eu lembro como se fosse hoje, quando eu contei que a inscrição da transferência tinha saído e que eu tinha feito, ele me perguntava todos os dias, e aí deu certo? E eu dizia, não ainda não saiu, e você falava, vai dá certo e me encorajava. Eu sei que você torce por mim, e que cada conquista minha é como se fosse sua, porque cada conquista sua também é como se fosse minha. Obrigada, amo você. Quero agradecer por ter me dado o meu sobrinho Oliver, que é o amor de titia e que quando está perto, deixa meus dias mais leves e divertidos, titia Lala te ama.

A minha irmã Izadora, que sempre vibrou com cada conquista minha, quando eu passei pra odonto, ela dizia para todo mundo que chegava perto dela, ei minha irmã passou pra odonto, com tanto amor, orgulho e carinho. Tenho orgulho de você, e da mulher que está se tornando, eu amo você Iza.

Aos meu irmãos, Josimá Filho mais conhecido como BB e a Manoel Netto, mais conhecido por Netinho, que são meus amores, tudo com vocês fica mais leve e divertido. Também quero agradecer a Sirleide por toda a ajuda e apoio que foi dado ao longo dessa caminhada, amo vocês.

Agradeço ao meu primo Aryston, obrigada por tanto, e por ter me ajudado a realizar esse sonho, você é uma das pessoas que foi fundamental, em toda a minha caminhada até aqui. Você, cuidou de mim e abraçou a minha causa como se fosse sua, e me deu todo suporte necessário para eu seguir. Amo você, não tenho palavras para expressar tamanha gratidão, por tudo.

A Alisson e Ayanne, que também me dão todo amor, carinho, que me ajudam no que for preciso, e não medem esforços para isso. Obrigada por tudo que vocês fazem e fizeram por mim. Eu amo muito vocês.

As minhas primas Mayara mais conhecida como Babazinha, e Mayave. Obrigada, por cada conversa, cada conselho. Por sempre vibrarem com as minhas conquistas, obrigada por me ajudarem nessa trajetória. Eu amo vocês.

Ao meu primo Arlen, que é como se fosse um irmão pra mim, obrigada mago, por todo carinho amor e cuidado, amo você.

A minha amiga Malu, que é do ensino médio pra vida, obrigada por ter feito parte de toda a minha história desde do começo, por sempre está disposta a me ajudar. A nossa amizade é única e verdadeira, ela nunca muda, saiba que sempre vou está aqui pra você como você sempre esteve pra mim, e que a nossa conexão é tão grande que a gente só sai combinando, mesmo sem combinar (não podia deixar de falar desse detalhe). Te amo.

A minha dupla Fernanda, amiga obrigada por compartilhar tudo comigo, você foi meu porto seguro durante essa caminhada, quando eu não acreditava em mim mesma, você acreditava, quando eu dizia amiga, eu pensei que não ia conseguir, você dizia, eu sabia que você ia conseguir. Sem você para compartilhar, loucuras, risadas, choros, aflições e alegria teria sido mais difícil, obrigada por ser meu ponto de equilíbrio na clínica, a nossa conexão é tão grande que a gente conversa pelo olhar quando estamos atendendo juntos, e que sorte a minha ter você. Eu te amo Fernandinha.

Aos meu amigos, Laura, Virna, Agabio, Lucas, Emanuel, Pedro, Bruna, Leticia e Thalia, vocês fazem os dias de clínica e de aula mais felizes, obrigada por cada sorriso, cada lágrima e aperseio compartilhado, vocês fazem tudo ficar mais leve.

A Ana Beatriz, a gente se aproximou agora no finalzinho, mas sem dúvidas Bia foi uma das pessoas que mais me ajudou, obrigada amiga, o meu carinho por você é enorme, apesar de você ser abusada, brincadeira, a academia com você fica mais leve e a universidade também, e

saiba o que precisar de mim, estarei sempre aqui, e sempre serei grata por cada conversa, dica e conselho.

Quero agradecer a LAFIA, Ary, Sonaly, Pietra, Ju, Fabricio, André, Lucas, João Miguel, Sérgio e Viton, vocês fazem os dias de LAC mais divertidos, e as fofocas são as melhores, além de sempre agitarem os sábados a tarde com as brigas por causa da lista.

Quero agradecer a Vitória Cristina, amiga sem dúvidas você é especial, sua alegria e a sua força me inspiram, obrigada por fazer meus dias mais felizes com as suas brincadeiras e por está sempre disposta a me ajudar.

A Waldo que é minha dupla na LAC, você é uma pessoa muito legal, e que me ajuda muito, até mesmo quando digo que quero um paciente, você tenta arranjar, obrigada amigo.

E a TXXI, por tudo e todos os momentos compartilhados ao longo da graduação.

Quero agradecer ao meu orientador Abrahão Alves de Oliveira Filho, o senhor exerce a sua profissão com tanto amor, que faz com que a gente se sinta acolhido, e que o processo seja mais leve, obrigada por cada conselho, cada palavra amiga, e pelas melhores conversas no laboratório depois das reuniões. O senhor pra mim, é uma fonte de inspiração como pessoa e profissional. O meu pai acadêmico como costume falar, são quase 6 anos de LAFBIM e que compartilho a jornada acadêmica com o senhor, obrigada por esses anos, e por confiar em mim, quero que saiba que sem você essa caminhada não teria sido a mesma.

Agradecer a minha co-orientadora Raline Mendonça dos Anjos, a senhora é uma pessoa doce, obrigada por toda orientação e cuidado.

Quero agradecer ao meu mestre Julierme Ferreira Rocha, por ter despertado o meu amor pela cirurgia, e por ter me dado oportunidade de fazer parte da LAC, tenho uma admiração muito grande pelo senhor, obrigada por cada ensinamento, cada conselho. O senhor ensina que a gente precisa ter humildade, para conseguir alcançar os nossos objetivos. Nunca deixe de ser esse caboclo sonhador, você é inspiração na cirurgia.

Obrigada a Liga Acadêmica de Fitoterapia Bioquímica e Microbiologia (LAFBIM), e a Liga Acadêmica de Cirurgia (LAC), por todo conhecimento compartilhado ao longo desses anos, as ligas do meu coração, que tenho orgulho em fazer parte.

Quero agradecer também a Elizandra Silva da Penha, Eli eu nunca esqueço o que você fez por mim, obrigada pelo apoio e força para seguir, você é inspiração pra mim, um ser humano incrível. Você é luz, as clínicas de desnutrição e infantil ficam mais leves com você. E a todo o corpo docente, do curso de odontologia da UFCG.

“ O próprio Senhor irá à sua frente e estará com você, ele nunca o deixará,nunca o abandonará.Não tenha medo, não desanime.”

Deuteronômio 31:8

RESUMO

O biofilme oral possui uma grande variedade de microorganismos, em sua maioria bactérias, responsáveis pelo desenvolvimento de diversas infecções, como por exemplo doenças periodontais. A doença periodontal, é de origem infecciosa e inflamatória, causada pelas bactérias presentes no biofilme, ela age destruindo os tecidos de proteção e sustentação dos elementos dentários, envolvendo os fatores locais, sistêmicos, ambientais e genéticos. Estudos apontam que doença periodontal tem relação direta com várias morbidades sistêmicas, dentre elas podemos destacar os problemas respiratórios, onde a pneumonia nosocomial tem se destacado, pois existe relação entre ela e os microorganismos presentes na cavidade oral, dentre eles podemos destacar a *Klebsiella pneumoniae*. A resistência dessa bactéria a antimicrobianos, tem se tornado cada vez mais frequente, com isso, a busca de tratamentos alternativos vem aumentando, dentre eles os produtos naturais, principalmente os óleos essenciais, pois possuem inúmeras atividades terapêuticas contra vários microorganismos, dentre eles vamos destacar o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* que possui atividades antimicrobiana, antiaderente, anti-inflamatória, entre outras. Sendo assim, o objetivo dessa pesquisa é analisar o possível potencial antimicrobiano e antiaderente do óleo essencial da *Gaultheria procumbens* contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Para a realização dessa pesquisa foram utilizadas as técnicas de Concentração Inibitória Mínima (CIM), que foi determinada pela técnica de microdiluição em placas contendo 96 orifícios estéreis, a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi lida 48 horas após a CIM, utilizando placas com 96 orifícios. Com a realização dessa pesquisa foi observado que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) variou de 256 µg/mL a 1024 µg/mL, foram testadas 6 cepas dentre elas a ATCC e 101 que apresentou uma CIM de 256 µg/mL, na 102 e 104 de 512 µg/mL, na 103 de 1024 µg/mL, já a cepa 105 apresentou CIM maior que 1024 µg/mL. Já na Concentração Bactericida Mínima (CBM) variou de 1024 µg/mL a 256 µg/mL onde na cepa ATCC apresentou CBM igual a 256 µg/mL, enquanto as cepas 101, 102, 103 e 104 apresentaram CBM igual a 1024 µg/mL. Dessa forma, observa-se que o óleo essencial em questão apresentou efeito antibacteriano frente as cepas testadas.

Palavras-chave: Farmacologia. Fitoterapia. Odontologia.

ABSTRACT

The oral biofilm contains a wide variety of microorganisms, mostly bacteria, which are responsible for the development of various infections, such as periodontal disease. Periodontal disease is of infectious and inflammatory origin, caused by the bacteria present in the biofilm. It acts by destroying the protective and supporting tissues of the dental elements, involving local, systemic, environmental and genetic factors. Studies show that periodontal disease has a direct relationship with various systemic morbidities, including respiratory problems, where nosocomial pneumonia has been highlighted, as there is a relationship between it and the microorganisms present in the oral cavity, including *Klebsiella pneumoniae*. The resistance of this bacteria to antimicrobials has become increasingly frequent, so the search for alternative treatments has increased, including natural products, especially essential oils, as they have numerous therapeutic activities against various microorganisms, including the essential oil of *Gaultheria procumbens*, which has antimicrobial, anti-adherent and anti-inflammatory activities, among others. The aim of this research was to analyze the possible antimicrobial and anti-adherent potential of *Gaultheria procumbens* essential oil against strains of *Klebsiella pneumoniae*. To carry out this research, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) technique was used, which was determined by the microdilution technique in plates containing 96 sterile holes, and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) will be read 48 hours after the MIC, using plates with 96 holes. This research showed that the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ranged from 256 µg/mL to 1024 µg/mL. Six strains were tested, including ATCC 101, which had a MIC of 256 µg/mL, 102 and 104 of 512 µg/mL, 103 of 1024 µg/mL, while strain 105 had a MIC greater than 1024 µg/mL. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ranged from 1024 µg/mL to 256 µg/mL, where the ATCC strain had an MBC equal to 256 µg/mL, while strains 101, 102, 103 and 104 had an MBC equal to 1024 µg/mL. This shows that the essential oil in question had an antibacterial effect on the strains tested.

Keywords: Pharmacology. Phytotherapy. Dentistry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> contra diferentes cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
Tabela 2. Concentração Bactericida Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial de <i>Gaultheria procumbens</i> contra diferentes cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Ágar Muller-Hinton
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMA	Concentração Inibitória Mínima de Aderência
CSTR	Centro de Saúde e Tecnologia Rural
DMSO	Dimetilsufóxico
MH	Muller Hinton
mL	Mililitro
p/v	Peso por volume
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
v/v	Volume de soluto/ volume de solução
Mg	Micrograma
µg/ml	Micrograma por mililitro
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
4 METODOLOGIA	20
4.1 Ensaio <i>in vitro</i>	20
4.1.1 Substâncias-teste	20
4.1.2 Espécies Bacterianas e Meio de cultura	20
4.1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	20
4.1.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6 CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

Na cavidade oral existem várias espécies de bactérias, algumas delas são responsáveis pela formação do biofilme que se adere as superfícies dos dentes (Oliveira *et al.*, 2007;Barbosa *et al.*, 2010; Kuboniwa *et al.*, 2012; Pasich *et al.*, 2013; Roriz *et al.*, 2014; Janus *et al.*,2015). Com isso, existem vários fatores que levam esse biofilme a entrar em disbiose, e isso faz com que haja um desequilíbrio do mesmo, levando a manifestações de infecções orais, sendo necessário que haja um controle do biofilme para que ele entre em simbiose e evite a proliferação de bactérias patogênicas (Kilian *et al.*, 2016).

Diversas patologias orais podem ser originadas pelo acúmulo do biofilme, as mais frequentes são a cárie, doenças periodontais e halitose. A remoção regular do biofilme supra e subgingival pode ser considerada o principal fator na prevenção e tratamento destas doenças, além disso, a remoção do biofilme supragengival tem se mostrado eficaz na prevenção da inflamação gengival e no desenvolvimento da periodontite. Com isso, a escovação e a desorganização do biofilme são de suma importância para evitar, que a cavidade oral entre em desequilíbrio,para evitar qualquer patologia causada pelo acúmulo do biofilme (Pedrazzi *et al.*, 2009).

O biofilme pode sofrer alteração em sua composição, principalmente nos indivíduos hospitalizados que pode levar a produção de patógenos, inclusive os respiratórios, dentre eles podemos destacar a *Klebsiella pneumoniae*, que causa um processo infeccioso inerente a pneumonia nosocomial (Oliveira *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2010; Kuboniwa *et al.*, 2012; Pasich *et al.*, 2013; Roriz *et al.*, 2014; Janus *et al.*, 2015).

A *Klebsiella pneumoniae*, é uma bactéria gram negativa, considerada patogênica e pode causar infecções no trato urinário, infecções respiratórias e bacteremia. Ela forma biofilmes em dispositivos médicos como por exemplo cateteres e por isso ela desenvolve muitas infecções nosocomiais (Schrol *et al.*,2010).

O uso exagerado dos antibióticos e a automedicação cresceram muito nos últimos anos, e isso gerou um problema para a população, pois os patógenos criam resistência ao antibiótico. Existem as bactérias multirresistentes que colocam a saúde do ser humano em risco, e a eficácia do antibiótico contra elas, já é questionável em consequência do seu uso exagerado (Pofiro *et al.*, 2009).

Sendo assim, a descoberta de meios alternativos para o tratamento das doenças é de suma importância, por exemplo descobertas de novos antimicrobianos. Vale destacar também

o uso de plantas medicinais, que eram usadas no passado pelos nativos para tratar as doenças infecciosas. É notório que a busca por tratamentos com produtos naturais vem aumentando com o passar do tempo, visto que as plantas medicinais apresentam inúmeras atividades farmacológicas, e além disso o seu baixo custo e a sua aceitação pela população (Yunes *et al.*, 2001; Palombo, 2011)

Também existem os óleos essenciais que são produtos naturais obtidos do metabolismo secundário das plantas, e possuem como característica o seu cheiro agradável que atrai animais polinizadores, e eles realizam na separação das sementes, além disso ajudam na defesa das plantas. Os óleos são líquidos, voláteis e são lipofílicos, podendo ser encontrados em várias partes da planta, como flores, folhas, raízes, frutas. O estudo sobre os óleos despertou o interesse da indústria farmacêutica e alimentícia, pois o uso dos mesmos ajuda em uma preservação maior dos alimentos, já na indústria farmacêutica observou-se que eles possuem atividades antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, antivirais, dentre outras (Bakkali *et al.*, 2008).

A *Gaultheria procumbens* é uma Ericaceae, é uma espécie nativa da América do Norte. Ela é um pequeno arbusto, com folhas verdes e frutos vermelhos que possui características aromáticas. É uma planta medicinal, muito utilizada para tratar inflamações, artrite reumatoide, dores de inchaço, traqueíte crônica, constipação aguda e crônica. As suas atividades analgésicas e anti-inflamatórias são derivadas do ácido salicílico, especialmente salicilato de metilo (óleo essencial), que possui efeitos antioxidante. No entanto, poucos estudos relatam a atividade antibacteriana do óleo essencial dessa espécie (Michel *et al.*, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial frente as diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*;
- Verificar a Concentração Bactericida Mínima do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae*;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A cavidade oral é uma das partes mais colonizadas por microorganismo do nosso corpo, pois nela se faz presente comunidades microbianas heterogêneas, que constituem uma importante ligação entre a saúde bucal e a saúde geral do corpo humano (Kilian *et al.*, 2016).

O biofilme dental é criado a partir de várias espécies bacterianas, que se aderem a superfície dos elementos dentários, formando uma comunidade microbiana complexa. O crescimento desse biofilme, leva a proliferação de bactérias periodontopatogênicas, que se desenvolvem de acordo com o substrato disponível e as concentrações de oxigênio (Trein *et al.* 2016).

A Doença Periodontal é uma infecção crônica, que tem como fator etiológico primário o biofilme dental, onde a presença de bactérias gram-negativas é elevada quando a cavidade oral está em disbiose, sendo assim ocorre uma resposta inflamatória e imunológica do hospederio à presença das bactérias e seus produtos, levando a destruição dos tecidos de proteção e sustentação dos elementos dentários (Almeida *et al.*, 2006).

Estudos recentes mostram a importância do tratamento odontológico, principalmente periodontal, na prevenção e/ou melhora da condição sistêmica do paciente. A falta de saúde oral, acarreta a disseminação de microorganismos patogênicos com efeito metastático sistêmico, principalmente em pessoas com a saúde comprometida. A falta de higienização na cavidade oral, causa o aumento da concentração de patógenos na saliva, que podem ser aspirados para o pulmão em quantidade suficiente para prejudicar a defesa imunológica do paciente, levando ele a desenvolver pneumonia nosocomial (Gadelha *et al.*, 2011).

A pneumonia é uma infecção aguda dos pulmões, que acomete o sistema respiratório, seus sintomas são tosse, respiração curta e rápida, produção de secreção, dores no peito, febre, fadiga, dores musculares e falta de apetite (Amaral, *et al.*, 2009).

As infecções nosocomiais são causada pela *Klebsiella pneumoniae*, que é um patógeno oportunista, ela se manifesta principalmente em pessoas com o sistema imunológico comprometido (Vuotto *et al.*, 2014).

A *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria gram-negativa, aeróbia facultativa, que possui forma de um bastonete, ela pertence à família Enterobacteriaceae, que encontram-se vastamente distribuídas no meio ambiente e na microbiota normal do trato intestinal de humanos e animais (Murray *et al.*, 2004).

A *Klebsiella pneumoniae* foi identificada por Carl Friendlander em 1882, ele coletou amostras de pulmões de pacientes que foram a óbito devido à pneumonia, com isso constatou-se que ela era responsável pela causa de pneumonias graves e fatais (Koneman *et al.*, 2008).

As características bioquímicas do gênero *Klebsiella* são fermentação de glicose, reação de oxidase negativa, nitrato reduzido, citrato e indol negativos, lisina positiva, tríplice açúcar ferro (TSI) positivo com produção de gás, ornitina negativa, metaboliza a lactose, utiliza o citrato como fonte de carbono e também hidrolisa a uréia, apresentando gás ou não (Koneman *et al.*, 2001).

As infecções causadas pela *Klebsiella pneumoniae*, são mais frequentes em pacientes nosocomiais, que possuem um certo tipo de comprometimento no sistema imunológico. Ela também pode causar infecções do trato urinário e de feridas, bacteremia, pneumonia, rinite crônica atrofica, artrites, enterites, meningites em crianças e sepse (Madison *et al.*, 1994).

Vários fatores levam a *Klebsiella spp. a* ser considerada patogênica tais como: produção de enterotoxina estável ao calor, facilidade de metabolizar a lactose, presença de adesinas com ou sem fímbrinas que auxilia sua fixação às mucosas das células epiteliais do trato urogenital, respiratório e intestinal para causar o processo infeccioso, e proteger a bactéria dos fatores bactericidas do soro acompanhado pela interrupção da ativação dos componentes do complemento. Ela apresenta uma cápsula que apesar de ajudar a defender o microrganismo da morte no soro, existem outros fatores que evitam a ligação do complemento à bactéria, levando a eliminação da bactéria mediada pelo complemento (Alencar *et al.*, 2016).

A descoberta de antibióticos eficientes no tratamento de infecções bacterianas, foi uma grande descoberta para o avanço na medicina, pois eles reduziram consideravelmente o número de mortes causadas por doenças infecciosas. No entanto, o aumento crescente do uso de antibióticos de forma errada, tem potencializado a resistência das cepas de bactérias a esses medicamentos, pois as bactérias desenvolveram um mecanismo de defesa aos agentes antimicrobianos. E essa resistência bacteriana contra os antibióticos e os agentes quimioterápicos, tem deixado as opções de tratamentos escassas, o que se torna uma ameaça a saúde pública (Silveira *et al.*, 2006).

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema preocupante à saúde pública, pois os novos recursos terapêuticos não acompanham a evolução dos mecanismos de resistências dos microorganismos. Outro fator importante que leva essa causa é os hábitos errôneos da população, em relação ao uso de antimicrobianos, que acabam comprometendo a sua eficácia. A resistência bacteriana é um processo decorrente de alguns eventos, entre eles o uso indiscriminado de antibióticos e alteração nos genes bacterianos, que levam a

alterações morfológicas, metabólicas e estruturais nas células bacterianas (Corrêa *et al.*, 2013).

A *Klebsiella penumonie* vem se tornando cada vez mais uma ameaça a saúde da população, e os mais expostos as infecções por meio dessa bactéria são os pacientes internados em hospitais, como neonatos e pacientes dos centros de terapia intensiva. Isso está relacionado com seus fatores de virulência, bem como, as mudanças e evoluções morfológicas e estruturais que ocorrem na célula da bactéria. Sendo assim, com essas constantes mudanças na sua morforlogia ela cria resistência aos antimicrobianos, levando assim ao insucesso aos tratamentos (Verdi *et al.*, 2016).

Contudo a busca de tratamentos alternativos vem aumentando, e a fitoterapia tem ganhado espaço no meio da medicina e da odontologia, pois os produtos naturais possuem uma alta atividade terapêutica, além de apresentar menor toxicidade e melhor biocompatibilidade cientificamente comprovadas, quando comparados aos medicamentos convencionais (Gomes *et al.*, 2020).

A fitoterapia ganhou um maior reconhecimento , por vários fatores tais como: possuir menor custo e ser capaz de desempenhar atividades antimicrobianas, anestésica, anti-inflamatórias, entre outras. Com isso ela se tornou uma alternativa à terapia dos medicamentos sintéticos (Evangelista *et al.*, 2013).

Em meio a tantos produtos naturais que possuem atividades terapêuticas, os óleos essenciais vem ganhando um destaque, eles são utilizados frequentemente na aromaterapia, apresentam um grande potencial terapêutico e farmacológico (Edris *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais são compostos naturais, líquidos, complexos, bioativos, voláteis, com aroma e cor característicos. A formação desses óleos são por meio do metabolismo secundário das plantas, e o seus metabólitos secundários então presente em todos os órgãos delas, como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas e cascas. Eles são formados principalmente por classes de ésteres de ácidos graxos, mono e sesquiterpenos, terpenos, fenilpropanonas e álcoois aldeidados (Almeida *et al.*, 2020).

Os estudos vem mostrando que os óleos apresentam algumas atividades terapêutica, ressaltando as seguintes: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relaxante, anti-séptica das vias respiratórias, larvicida, vermífuga e anti-inflamatória (Nascimento *et al.*, 2006).

4 METODOLOGIA

4.1 Ensaio *in vitro*

4.1.1 Substâncias-teste

O óleo essencial de *Gaultheria procumbens* foi adquirido da Indústria Harmonie Aromaterapia® (Florianópolis - SC). Para a realização dos ensaios farmacológicos, a substância foi solubilizada em DMSO e diluído em água destilada. A concentração de DMSO (dimetilsulfóxido) 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 AFC914D.

4.1.2 Espécies Bacterianas e Meio de cultura

Foram utilizadas as seguintes cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Kp ATCC 29212, Kp 101, Kp 102, Kp 103, Kp 104, Kp 105). As cepas foram mantida em meio Ágar Muller Hinton (AMH) a uma temperatura de 4 °C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em AMH incubadas a 35°±2° C. No estudo da atividade antimicrobiana foi utilizado um inóculo bacteriano de aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC/mL padronizado de acordo coma turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (Cleeland; Squires, 1991; Hadacek, Greger, 2000).

4.1.3 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 *Gaultheria procumbens*, nas concentrações de 1024 a 4 µg/mL. A determinação da CIM foi conduzida com 10 µL do microrganismo em cada cavidade, aproximadamente 1,5 x 10⁸ 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°±2° 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 $35^{\circ}\pm 2^{\circ}$ 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 pararosa, indicando crescimento do microrganismo (Bona *et al.*, 2014; Clsi, 2012; Palomio *et al.*, 2002).

4.1.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após a leitura dos resultados, foram feitos inóculos (10 μ l) de três diluições a partir da CIM para o meio de caldo Mueller-Hinton (100 μ l/cavidade) em placa de microdiluição esterilizada para a determinação da CBM. Após a incubação a $35^{\circ}\pm 2^{\circ}$ C por 24 horas, foi adicionado 20 μ L de resazurina. Os ensaios foram incubados a temperatura de $35^{\circ}\pm 2^{\circ}$ C por mais 24 horas para confirmação da concentração capaz de inibir o crescimento total das espécies bacterianas, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador (Ncube *et al.*, 2008; Guerra *et al.*, 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana do óleo essencial é avaliada através da menor concentração da substância teste necessária para inibir o crescimento do microrganismo exposto, esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Bona *et.al.*, 2014). Nesse experimento, o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* (Whintergreen), apresentou efeito antibacteriano em cinco das seis cepas de *Klebsiella pneumoniae* com valores da CIM variando de 256 µg/mL a 1024 µg/mL, ea sexta cepa apresentou CIM maior que 1024. Como mostra a tabela a baixo:

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* contra diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*

	<i>KP</i> <i>ATCC</i>	<i>KP</i> <i>101</i>	<i>KP</i> <i>102</i>	<i>KP</i> <i>103</i>	<i>KP</i> <i>104</i>	<i>KP</i> <i>105</i>
1024 µg/mL	+	+	+	+	+	*
512 µg/mL	+	+	+	-	+	*
256 µg/mL	+	+	-	-	-	*
128 µg/mL	-	-	-	-	-	*
64 µg/mL	-	-	-	-	-	*
32 µg/mL	-	-	-	-	-	*
Controle negativo	-	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+	+

Legenda: (KP) *Klebsiella pneumoniae* (+) Inibição (-) Sem inibição (*) maior que 1042µg/mL

Fonte: Próprio autor

A concentração bactericida mínima (CBM) tem como objetivo, avaliar se a substância que está sendo analisada é capaz de matar ou inibir o crescimento da bactéria, os resultados da concentração bactericida mínima (CBM) variou de 1024 µg/mL a 256 µg/mL. Como mostra a tabela abaixo:

Tabela 2. Concentração Bactericida Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* contra diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*

	KP ATCC	KP 101	KP 102	KP 103	KP 104
1024 $\mu\text{g/mL}$	+	-	-	-	-
512 $\mu\text{g/mL}$	+	-	-	-	-
256 $\mu\text{g/mL}$	+	-	-	-	-

Legenda: (KP) *Klebsiella pneumoniae* (+) Inibição (-) Sem inibição (*) maior que 1042 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: Próprio autor

Conforme proposto por Sartoratto *et al.* (2004), a atividade antimicrobiana para óleos essenciais é classificada como forte quando estes apresentarem uma CIM de até 500 $\mu\text{g/mL}$, moderada para valores de CIM entre 600 a 1500 $\mu\text{g/mL}$ e fraca para CIM acima de 1500. Dessa forma, os resultados identificados na presente pesquisa atesta que o óleo essencial de *Gaultheria procumbens* (Whintergreen) possui uma forte inibição contra a cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC e a *Klebsiella pneumoniae* 101, enquanto as *Klebsiella pneumoniae* 102, 103 e 104 apresentaram uma inibição moderada e a *Klebsiella pneumoniae* 105 não apresentou inibição.

De acordo com Hafidh *et al.* (2011), para uma substância ser considerada bactericida a sua CBM deve ser igual ou duas vezes o valor da CIM, para ser considerada bacteriostática a sua CBM deve ser maior que duas vezes o valor da CIM. Logo, os resultados encontrados nesta pesquisa revelam que o óleo essencial de *Gaultheria pocumbens* (Whintergreen) apresenta um potencial bactericida de frente a cepa ATCC, e bacteriostático para as cepas 101, 102, 103 e 104.

Corroborando com os dados nessa pesquisa o estudo de Nicolich *et al.* (2013), mostrou efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Gaultheria pocumbens* contra uma ampla gama de bactérias e fungos gram-positivos e gram-negativos, bem como bom potencial antioxidante e anti-radical. Além disso, o óleo essencial inibiu o crescimento de todos os microorganismos testados, dentre eles o *Streptococcus mutans* oral inibindo a formação do biofilme, conseguiu inibir também fungo como a *Candida albicans*. Nesse estudo foram encontrados oito componentes com salicilato de metila, sendo mais dominante no óleo essencial de *G. procumbens*, o que pode levar ao seu efeito antibacteriano.

No estudo Verdi *et al.* (2022), também mostra atividade antibacteriana do óleo essencial de *G. procumbens*, para realização do presente estudo foi realizada a mesma técnica de CIM e CBM utilizadas nessa pesquisa, e seus resultados mostraram eficácia contra vários microorganismos, incluindo *Aeromonas caviae*, *Candida albicans*, e *Mycobacterium fortuitum*.

Assim como no estudo foi citado que óleo essencial da *Gaultheria procumbens*, apresenta efeito anti-inflamatório, na pesquisa Michel *et al.* (2014), mostra que o extrato das folhas secas de *G. procumbens* contém quantidades consideráveis de polifenóis antioxidantes, que possuem capacidades antioxidantes significativas e dependentes da dose *in vitro*, além disso, possui atividade anti-inflamatória moderada, que está relacionada a sua composição fenólica. Tendo em vista isso, os ácidos fenólicos são os principais responsáveis pela capacidade antioxidante testada no estudo, enquanto os flavonoides são os principais determinantes dos efeitos anti-inflamatórios.

No estudo de Olszewska *et al.* (2021), mostra que a espécie vegetal *Gaultheria procumbens* pode ser uma planta utilizada na fitoterapia, suas partes aéreas, folhas e caules de são ricos em polifenóis com efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, então no estudo foi utilizado os extratos dessas partes. Com isso, ele conseguiu inibir duas enzimas pró-inflamatórias importantes ciclooxigenase (COX-2 e hialuronidase), e a maioria delas, exceto gaultherin, exerceu potente atividade antioxidante direta. Além disso, apresentou segurança celular, que foi confirmada para todos os compostos por citometria de fluxo.

6 CONCLUSÃO

Com a realização dessa pesquisa observa-se que o óleo essencial de *Gaultheria pocumbens* (Whintergreen) apresentou um efeito antibacteriano, com características bactericida e bacteriostática, contras as cepas testadas na metodologia aplicada. No entanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar esse potencial, em especial estudos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, M. P. I. *et al.* *Klebsiella pneumoniae*: uma revisão bibliográfica, **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 1, n.1, 2016.
- ALMEIDA, R. F. *et al.* Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. **Revista Portuguesa De Medicina Geral E Familiar**, v. 22, n. 3, p. 379- 90,2006.
- ALMEIDA, J. C. *et al.* Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018., **Revista Nutri Time**, v. 17, n. 1,p. 8623-8633, 2020.
- AMARAL, S. M. *et al.* Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. **J Bras Pneumol**, v. 35 ,n. 11, p. 1116-1124, 2009.
- BAKKALI, Fadil *et al.* Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, J. C. S *et al.* Perfil dos pacientes sob terapia intensiva com pneumonia nosocomial: principais agentes etiológicos. **Rev Odontol Unesp**, v. 39, n. 4, p. 201-6,2010.
- BONA EAM, Pinto FGS, Fruet TK, Jorge TCM, Moura AC. Comparação dos métodos de avaliação da actividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extractos de plantas aquosas e etanolicas. **Arquivos do Instituto Biológico**. 2014; 81(3):218-225. 33.
- CORRÊA, A. D. *et al.* Uma abordagem sobre o uso de medicamentos nos livros didáticos de biologia como estratégia de promoção de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva** v. 18, n. 10, p. 3071-3081, 2013.
- EDRIS, A. E. *et al.* . Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 4, p. 308-23,. 2007.
- EVANGELISTA, S. S. *et al.* Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 15, n. 4, p. 513-519, 2013.
- GADELHA, R. L . *et al.* 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 e Ciência**, v. 2, n. 1, p. 95-104, 2011.
- GUERRA FQS, Mendes JM, Oliveira WA, Costa JGM, Coutinho HDM, Lima EO. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume sobre estirpes de *Acinetobacter* spp. resistentes a múltiplas drogas. **Revista de Biologia e Farmácia**. 2012; 8(1):62-70.
- GOMES, M. S. *et al.* Uso de plantas medicinais na odontologia: uma revisão integrativa. **Revista de Ciência da Saúde Nova Esperança**,v. 18, n. 2, p. 118-126, 2020.
- HAFID,RR. *et al.* Inibição do crescimento de agentes patogênicos bacterianos e fúngicos altamente resistentes por um produto natural. *A Revista Microbiológica Aberta*. 2011; 5:96.

JANUS, M. M. *et al.* *In vitro* phenotypic differentiation towards commensal and pathogenic oral biofilms. **Biofouling**, v. 31, p. 503–10, 2015. KILIAN, M. , CHAPPLE, I., HANNIG, M. *et al.* The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. **Br Dent J**, v. 221, p. 657–666, 2016.

KONEMAN, E. W. *et al.* Enterobacteriaceae. **Texto e Atlas Colorido**, 5ª ed., p.177-250, 2001.

KUBONIWA, M. *et al.* Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. **Expert Rev Proteomics**, v. 9 p. 311–23, 2012.

MADISON, B., OFEK, I., CLEGG, S., ABRAHAM, S. N. Type 1 Fimbrial Shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Influence Sugar-Binding Specificities of Their FimH Adhesins. **Infection and Immunity**. v. 62, n. 3, p. 843-848, 1994.

MARTÍNEZ, J. *et al.* How are gene sequences analyses modifying bacterial taxonomy: the case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 261-268, 2010.

MICHEL, P. *et al.* Polyphenolic Profile, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Eastern Teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) Leaf Extracts. **Molecules**, p. 1420-3049, 2014.

MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6 Eª. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

MURRAY, P. R.; PFOLLER, M. A; ROSENTHAL, K. S. **Microbiologia Médica**. 4º edição. Rio de Janeiro-RJ. Editora Guanabara 2004.

NASCIMENTO, PAULA F. C. *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2006.

NCUBE NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**. 2008; 7(12):1797-1806. 37.

NICOLIC, M. *et al.* Composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Gaultheria procumbens* L. **Culturas e produtos industriais**, v.49, p. 561-567, 2013.

OLIVEIRA, L. C. B. S. *et al.* A presença de Patógenos Respiratórios no Biofilme Bucal de Paciente com Pneumonia Nosocomial. **Rev Bras Ter Intens**, v. 19 n. 4 p. 428-33, 2007.

OLSZEWS MA, Owczarek A, Magiera A, Granica S, Michel P. Screening for the Active Anti-Inflammatory and Antioxidant Polyphenols of *Gaultheria procumbens* and Their Application for Standardisation: From Identification through Cellular Studies to Quantitative Determination. **Int J Mol Sci**. 2021 Oct 26;22(21):11532

PALOMBO EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: Potential application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p. 1-15, 2011.

PALOMINO JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portales F. Placa de ensaio de microtitulação de resazurina: método simples e barato para a detecção da resistência às drogas Mycobacterium tuberculosis. **Agentes Antimicrobianos e Quimioterápicos**. v. 46 p. 2720-2722, 2002.

PASICH,E. *et al.* Mechanism and risk factors of oral biofilm formation. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 67, p. 736-41,2013. PEDRAZZI, V. *et al.* Métodos mecânicos para o controle do biofilme dentário supragengival . **R. Periodontia**, v. 19, n. 3, p. 26-33, 2009.

POFIRIO, Z. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de Lajoenseia pacari A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 785-789,2009.

RORIZ, V. M. , BOAVENTURA V. L. , DALBELLO D. N. G. Perfil periodontal e episódios de pneumonias nosocomiais em pacientes internados em uma UTI: estudo piloto. **Robrac**, v. 23 p. 207-11, 2014.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. **São Paulo: Atheneu**, 2005.

SARTORATTO, A., *et al.*, Rehder VLG. Composição e actividade antimicrobiana dos óleos essenciais de plantas aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Brasileira de Microbiologia**. 2004; 35(4):275-280.

SCHROLL, C., BARKEN, K. B., KROGFELT,K. A. *et al.* Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC Microbiol**, p.179-189, 2010.

SILVEIRA, G. P. *et al.* Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Quím. Nova**, v. 29 , n. 4, p. 844-55, 2006.

TREIN, M. P. *et al.* Formação de biofilme em diferentes concentrações de oxigênio. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**. v. 21 , n. 53 , p. 253-260, 2006.

VERDI, C. M. *et al.* Detecção laboratorial dos mecanismos de resistência da *Klebsiella pneumoniae*: Uma revisão. **Revista Saúde Integrada**, v. 9, n.17, p. 16-27, 2016.

VERDI, C. M. *et al.* Phytochemical characterization, genotoxicity, cytotoxicity, and antimicrobial activity of *Gautheria procumbens* essential oil. **Nat Prod Res**. 2022 Mar;36(5):1327-1331.

VUTTO, C., LONGO, F., BALICE, M.P. , DONELLI, G., VARALDO, P. E. Antibiotic Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, p. 743-758,2014.

YUNES, R. A.; PEDROSA., R. C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.