

DOI: <http://dx.doi.org/10.18265/1517-0306a2022id7245>

ARTIGO ORIGINAL

SUBMETIDO 14/09/2022

APROVADO 14/12/2022

PUBLICADO ON-LINE 19/12/2022

PUBLICADO 10/07/2024

EDITORA ASSOCIADA

Maria Angélica Ramos da Silva

Ação antibacteriana do linalol contra *Klebsiella pneumoniae* e suas interações com a ATP sintase *in silico*

 Françueuda Alves da Silva ^[1]

 Eliane Alves Lustosa ^[2]

 Gislane da Silva Rodrigues ^[3]

 Abrahão Alves
de Oliveira Filho ^[4]

 Cássio Ilan
Soares Medeiros ^{[5]*}

[1] eudaalves.biomed@gmail.com

[5] medeiros cassio4@gmail.com

Centro Universitário de Patos (UNIFIP),
Patos, Paraíba, Brasil

[2] elanelustosa18@hotmail.com

[4] abrahamo.farm@gmail.com

Universidade Federal de
Campina Grande (UFCG),
Campina Grande, Paraíba

[3] gislaine.srodrigues@uel.br

Universidade Estadual de Londrina (UEL),
Londrina, Paraná, Brasil

RESUMO: As infecções bacterianas e a resistência antimicrobiana, particularmente de *Klebsiella pneumoniae*, continuam sendo algumas das questões mais desafiadoras que ameaçam a saúde das pessoas em todo o mundo. Compostos naturais derivados de plantas têm recebido atenção considerável por seu papel como potencial antibacteriano e para mitigar a resistência a antibióticos. Entre esses compostos, identificou-se o linalol, importante metabólito secundário, encontrado em grande variedade de plantas, e que apresenta diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividade antibacteriana. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar, por meio do docking molecular, a atividade antibacteriana do linalol contra *Klebsiella pneumoniae* e suas interações com a ATP sintase. Neste trabalho, foram realizados ensaios *in vitro*, aplicando-se a técnica de microdiluição em caldo, obtendo-se a concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM). O procedimento adotado para o *docking* molecular foi o de ancoramento com a proteína rígida e os ligantes flexíveis. As análises *in vitro* mostraram que o linalol teve efeito bactericida contra *K. pneumoniae* na concentração de 256 µg/mL. O *docking* molecular revelou que o linalol interage com o centro ativo da subunidade B da ATP sintase, com energia de ligação $\Delta E = -3,63$ kcal/mol. Neste estudo foi demonstrado que o linalol é uma molécula capaz de induzir a morte bacteriana e que, preditivamente, esse efeito possivelmente ocorre por interrupção na síntese de ATP.

Palavras-chave: *docking* molecular; farmacologia; fitoterapia; *Klebsiella pneumoniae*; microbiologia.

Antibacterial action of linalool against *Klebsiella pneumoniae* and its interactions with ATP synthase *in silico*

ABSTRACT: Bacterial infections and antimicrobial resistance, particularly from *Klebsiella pneumoniae*, remain some of the most challenging issues threatening

*Autor para correspondência.

people's health worldwide. Plant-derived natural compounds have received considerable attention for their potential role as antibacterial agents and to mitigate antibiotic resistance. Among these compounds, we identified linalool, an important secondary metabolite found in a wide variety of plants, which has various pharmacological properties, including antibacterial activity. Therefore, this study aimed to investigate the antibacterial activity of linalool against *Klebsiella pneumoniae* and its interactions with ATP synthase through molecular docking. In this work, *in vitro* tests were performed, and the broth microdilution technique was applied, obtaining the minimum inhibitory and bactericidal concentration (MIC and MBC). In addition, the procedure adopted for molecular docking was rigid-protein, flexible-ligand docking. *In vitro* analyses showed that linalool had a bactericidal effect against *K. pneumoniae* at the concentration of 256 µg/mL. Molecular docking revealed that linalool interacts with the active center of the B subunit of ATP synthase with binding energy $\Delta E = -3.63$ kcal/mol. In this study, it was demonstrated that linalool is a molecule capable of inducing bacterial death and that predictively this effect possibly occurs by the interruption in ATP synthesis.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; microbiology; molecular docking; pharmacology; phytotherapy.

1 Introdução

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa, bacilar, oportunista, ubíqua em ambientes naturais (Bengoechea; Pessoa, 2019), pertencente à família *Enterobacteriaceae* (Wyres; Lam; Holt, 2020). É uma bactéria encapsulada, estrutura que contribui para seu forte poder de virulência, principalmente pela capacidade de auxiliar na evasão do sistema imunológico durante a infecção, protegendo-se da opsonização e, conseqüentemente, da fagocitose (Tavares, 2019). Na espécie humana, habita o trato gastrointestinal e a nasofaringe, podendo invadir a circulação e atingir outros tecidos, desencadeando infecções. Esse microrganismo é capaz de causar doenças como pneumonia, infecções urinárias, sanguíneas e sepse, que podem ser ainda mais graves em recém-nascidos, idosos e pessoas com o sistema imune comprometido (Bengoechea; Pessoa, 2019).

A *K. pneumoniae* apresenta grande capacidade de desenvolver mecanismos de resistência enzimáticos (Kolpa *et al.*, 2018), sendo considerada multirresistente a fármacos antimicrobianos, especialmente pela capacidade de produzir enzimas denominadas carbapenemases, as quais conferem resistência aos carbapenêmicos como o meropenem, avibactam, imipenem etc. (Afonso; Miler-da-Silva; Garrido, 2022). A *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC-KP) tem causado infecções de difícil tratamento (Aminul *et al.*, 2021), devido ao crescente número de cepas resistentes. Essa bactéria foi recentemente incluída pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na lista crítica de microrganismos para os quais novas opções terapêuticas devem ser urgentemente desenvolvidas (Bengoechea; Pessoa, 2019).

No que concerne à resistência bacteriana a antibióticos, Moo *et al.* (2021) destacam a importância do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, principalmente aqueles oriundos de plantas. Estas apresentam uma profusão de metabólitos secundários bioativos (Chassagne *et al.*, 2021), entre os quais se destacam os terpenos, comumente encontrados em óleos essenciais, que têm mostrado forte atividade antibacteriana contra diferentes organismos patogênicos (Mahizan *et al.*, 2019).

O linalol é um metabólito secundário natural de plantas, pertencente ao grupo dos monoterpenos com estrutura alcoólica e acíclica, com fórmula molecular $C_{10}H_{18}O$, identificado como um componente importante na produção de óleos essenciais de lavanda, manjerição etc. Além disso, essa molécula é bastante utilizada na indústria de perfumes, cosméticos, materiais de limpeza e em aditivos alimentares, apresentando também significativo potencial farmacológico, incluindo propriedades antissépticas, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antifúngicas, antibacterianas, hepatoprotetoras, entre outras (An *et al.*, 2021; Bueno-Duarte; Méndez-Sánchez, 2015). Os efeitos antimicrobianos contra uma grande diversidade de patógenos conferem ao linalol capacidade de ser utilizado como adjuvante de antibióticos, sendo de grande importância para superação da crescente ameaça de resistência microbiana (An *et al.*, 2021).

Como antibacteriano, o linalol parece afetar a integridade da membrana celular bacteriana, por interferir nos níveis de ATP e elevar as concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Wong-Ekkabut *et al.*, 2007). A adenosina trifosfato (ATP) sintase, presente nas células procarióticas e eucarióticas, é um complexo proteico com múltiplas subunidades que usa a força motriz eletroquímica dos prótons (H^+) para atravessar a membrana, a fim de fornecer um suprimento celular de ATP, a partir do difosfato de adenosina (ADP) e do fosfato inorgânico (Pi) (Guo; Suzuki; Rubinstein, 2019). Por esses aspectos, pressupõe-se que o linalol possivelmente interage com a ATP sintase bacteriana e, conseqüentemente, acaba interferindo na viabilidade de uma grande quantidade de vias metabólicas essenciais para a sobrevivência de *K. pneumoniae* (Wong-Ekkabut *et al.*, 2007).

Com base nessas informações, este estudo tem por objetivo investigar, por meio do *docking* molecular, o potencial antibacteriano do linalol contra *K. pneumoniae* e suas interações com a ATP sintase.

A seguir, serão apresentadas as demais seções que compõem este artigo, dispostas da seguinte maneira: a seção 2 apresenta os procedimentos metodológicos empregados na pesquisa; a seção 3 traz os resultados obtidos nas análises *in vitro* e *in silico* e uma discussão sobre esses resultados com base na literatura; e a seção 4 contempla as considerações finais do estudo, com indicação de pesquisas futuras.

2 Método da pesquisa

Esta seção apresenta os materiais utilizados na pesquisa bem como os procedimentos metodológicos empregados nos ensaios *in vitro* e *in silico*.

2.1 Substâncias

O linalol (3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol) (pureza > 95%) foi adquirido comercialmente da Quinari® (Ponta Grossa-PR, Brasil). Para os ensaios de atividade antibacteriana, o linalol foi solubilizado em 150 μ l (3%) de dimetilsulfóxido (DMSO), mistura à qual foram adicionados 100 μ l (2%) de tween 80. Essa solução foi completada com água destilada esterilizada (q.s.p. 5 ml), para obtenção de uma emulsão na concentração inicial de 1.024 μ g/ml, e diluída em série até 2 μ g/ml (Hood; Wilkinson; Cavanagh, 2003; Nascimento *et al.*, 2007).

2.2 Cepas bacterianas e inóculo

Os ensaios *in vitro* foram realizados com cepas bacterianas: *K. pneumoniae* 101, 103, 104, 105 (isolados clínicos) e *K. pneumoniae* ATCC 13883 (cepa padrão). Todas as amostras pertencem ao acervo do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LPM) do Centro Universitário de Patos (UniFIP). Todas as cepas foram mantidas em ágar nutriente (AN) a 4° C, e culturas de 24 horas incubadas a 37° C foram usadas para realizar os ensaios. Posteriormente, foram preparadas suspensões bacterianas, a partir dessas culturas recentes – aproximadamente 4 a 5 colônias foram transferidas (com alça estéril) para tubos de ensaio contendo 5,0 ml de solução salina estéril (NaCl a 0,85%). As suspensões resultantes foram agitadas durante 15 segundos com o auxílio de um aparelho vórtice (Fanem Ltda., Guarulhos-SP, Brasil). A turbidez dos inóculos finais foi normalizada, usando-se uma suspensão de sulfato de bário (tubo de 0,5 da escala de McFarland). A concentração final obtida foi de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) (CLSI, 2012; Hadacek; Greger, 2000).

2.3 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição, em caldo Brain Heart Infusion (BHI), duplamente concentrado em placa de 96 poços, com fundo em “U”, para obtenção de diferentes concentrações do linalol (1.024 µg/ml a 4 µg/ml). Paralelamente, controles de esterilidade, viabilidade celular e interferência dos veículos utilizados na preparação da emulsão do linalol foram realizados. A CIM é definida como a concentração mais baixa capaz de causar a inibição completa do crescimento bacteriano após 24 horas a 37 °C. A atividade antimicrobiana do linalol foi interpretada conforme os seguintes critérios: (< 100 µg/ml) forte atividade; (> 100 a 500 µg/ml) moderada atividade; (> 500 a 1.000 µg/ml) fraca atividade; e (> 1.000 µg/ml) produto inativo (Sartoratto *et al.*, 2004). A CBM foi determinada após a leitura da CIM, retirando-se alíquotas de 10 µl do sobrenadante dos poços onde não houve crescimento visível (concentrações suprainibitórias) (CIM, CIM × 2 e CIM × 4) e inoculando-as em novas placas de 96 poços contendo apenas BHI. Todos os controles foram, então, preparados, e os ensaios foram realizados em triplicata – os resultados foram expressos por sua média geométrica. A CBM é definida como a menor concentração de um agente químico capaz de causar a morte microbiana após 24 horas a 37 °C (CLSI, 2012; Ostrosky *et al.*, 2008).

2.4 Docking molecular

A estrutura química do linalol foi obtida do banco de dados de ligantes Zinc¹ e teve sua geometria otimizada com o software Avogadro (v. 1.2.0, Avogadro, Pittsburgh, Pennsylvania, USA), usando-se o método da mecânica molecular e o campo de força MMFF94 para moléculas orgânicas. A proteína F₁F₀ ATP sintase foi obtida do Protein Data Bank², com seus ligantes ATP e ADP cocrystalizados, apresentando o código 6OQW (3,10 Å); nela foi utilizada a subunidade B para o *docking* molecular.

O *docking* molecular foi realizado usando-se o software AutoDock Vina. As etapas de preparação da proteína incluíram a remoção de heteroátomos (água e íons), adição de hidrogênios polares e atribuição de cargas. Os sítios ativos foram delineados em torno do ligante cocrystal, com auxílio de um Grid Boxe de tamanho apropriado. O processo

[1] Ligante Zinc. Disponível em: <http://zinc.docking.org/substances/home/>.

[2] Protein Data Bank. Disponível em: <https://www.rcsb.org>.

de validação do *docking* foi baseado no *redocking*, que consiste em refletir a posição e orientação do ligante encontrado na estrutura cristalográfica. Assim, o valor do *Root Mean Square Deviation* (RMSD) deve ser $\leq 2,0$ Å. O procedimento adotado foi, portanto, o da ancoragem molecular com a proteína rígida (sem alterações nas posições dos átomos) e com o ligante flexível (Trott, Olson, 2010; Westermaier; Barril; Scapozza, 2015).

A visualização e preparação da estrutura cristalográfica da proteína e do ligante para o *docking* e o *redocking* foram realizadas no software PyMOL™ 2.0 (Schrödinger; Delano, 2020) e LigPlot v. 2.2.

3 Resultados e discussões

Nesta seção são apresentados os dados obtidos na análise *in vitro* sobre o efeito antibacteriano do linalol contra *K. pneumoniae* e os resultados da interação do linalol com a ATP sintase, utilizando-se a metodologia do *docking* molecular, assim como suas respectivas discussões.

3.1 CIM e CBM

K. pneumoniae tem sido a causa mais comum de pneumonia adquirida em hospitais, no mundo, responsável por 3% a 8% de todas as infecções bacterianas (Yu *et al.*, 2020), dados seus altos níveis de virulência e resistência a antibióticos, acarretando maiores dificuldades e custos para o tratamento de pacientes acometidos por essa bactéria bem como grandes desafios para o desenvolvimento de novos antimicrobianos e/ou abordagens terapêuticas (Lenchenko *et al.*, 2020).

Nesse sentido, as pesquisas e o desenvolvimento de antibacterianos precisam avançar, pois a última classe de antibióticos descoberta data de 1987. Além disso, dados da OMS alertam que, em 2050, não haverá antimicrobianos capazes de combater eficazmente as infecções bacterianas e, por conseguinte, esse será o tipo doença com maior mortalidade no mundo (Theuretzbacher, 2011; WHO, 2017).

A descoberta e/ou o desenvolvimento de um novo antibacteriano não são uma tarefa fácil, envolvendo múltiplas etapas de pesquisas, investimentos, estudos farmacoeconômicos etc. Muitas investigações exploram a fauna e a flora, pois estas têm sido rica fonte de descobertas de moléculas quimicamente interessantes do ponto de vista farmacológico. A diversidade e a versatilidade molecular encontradas nas plantas sempre atraíram o interesse de pesquisadores para investigação e seu aproveitamento como recursos de aplicabilidades terapêuticas (Gworek *et al.*, 2021; Katiyar *et al.*, 2012).

Um desses recursos são os óleos essenciais, bem como os seus componentes, que têm sido considerados fontes de novos antimicrobianos (El-Baky; Hashem, 2016). O linalol é um álcool terpênico, ou monoterpene, relatado na literatura científica como um relevante componente volátil encontrado nos óleos essenciais de muitas plantas. É uma substância natural com um perfume floral agradável, amplamente utilizado em cosméticos, especialmente fragrâncias e perfumaria, bem como em indústrias farmacêuticas e alimentícias (Pereira *et al.*, 2018a). Vários estudos têm demonstrado que o linalol exibe atividade antibacteriana contra uma grande variedade de bactérias Gram positivas e negativas, tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (Herman; Tambor; Herman, 2016; Prakash *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019).

Tabela 1 ▼

Efeito bactericida do linalol contra cepas de *K. pneumoniae*.

Fonte: dados da pesquisa

Neste estudo, o ensaio de suscetibilidade antimicrobiana revelou que o linalol exerce atividade antibacteriana contra células de *K. pneumoniae* na concentração de 128 µg/ml, inibindo completamente seu crescimento em meio de cultura (Tabela 1).

Cepas	Linalol			Efeito
	CIM (µg/ml)	CBM (µg/ml)	CBM/CIM	
<i>K. pneumoniae</i> 101	128	256	2	Bactericida
<i>K. pneumoniae</i> 103	128	256	2	Bactericida
<i>K. pneumoniae</i> 104	128	256	2	Bactericida
<i>K. pneumoniae</i> 105	128	256	2	Bactericida
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	128	256	2	Bactericida

No estudo de Yang *et al.* (2021), com cepas de *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 produtora de carbapenemase (KPC-KP), o linalol apresentou grande potencial de aplicação em monoterapia e na terapia combinada adjuvante-antibiótico, com uma CIM de 11,250 µg/ml, em comparação com o meropenem, um dos antibióticos utilizados como último recurso. Este demonstrou uma CIM de 32 µg/ml, que é uma concentração muito alta em comparação com os padrões do CLSI de 4 µg/ml contra *Enterobacteriaceae*. Além disso, a concentração subinibitória do linalol causou redução significativa na dosagem efetiva do antibiótico meropenem contra esse microrganismo. O efeito antimicrobiano do linalol parece estar relacionado principalmente a ruptura das membranas celulares, facilitando a absorção do antibiótico na célula e, conseqüentemente, a morte bacteriana (An *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021).

O efeito de um composto pode ser considerado bactericida quando o valor da razão CBM/CIM for ≤ 4 e bacteriostático quando $CBM/CIM > 4$ (Levison, 2004; Thomas *et al.*, 2012). Assim, neste estudo, o linalol apresentou efeito bactericida contra *K. pneumoniae*, pois a razão CBM/CIM foi igual a 2 (Tabela 1). No estudo de El-Baky e Hashem (2016), o linalol também apresentou efeito bactericida contra cepas de *K. pneumoniae*, com CBM/CIM igual a 4. No trabalho de Kwiatkowski *et al.* (2022), no qual foram analisados vários monoterpenos – entre eles o linalol – contra *K. pneumoniae* ATCC BAA-2473 produtora de uma nova metalo- β -lactamase-1, foi evidenciado um efeito bacteriostático dessa molécula, com $CBM/CIM = 8$. É importante ressaltar, no entanto, que esse desfecho provavelmente tem relação com a produção da enzima carbapenemase NDM-1 por esse microrganismo.

Interessantemente, o linalol também se mostrou promissor do ponto de vista farmacocinético, por apresentar características de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e efeitos tóxicos (ADMET) favoráveis, com biodisponibilidade oral teórica significativa, baixa toxicidade e alta semelhança com produtos farmacêuticos. Entretanto, em estudos *in vivo* com coelhos e ratos, observou-se que, após rápida absorção intestinal, o linalol é um indutor enzimático do sistema citocromo P-450 microsossomal, que metaboliza esse monoterpeno em 8-hidroxi linalol e 8-carbox linalol, que são excretados principalmente via trato urinário (Chadha; Madyastha, 1984; Pereira *et al.*, 2018a)

O uso terapêutico de fitoquímicos extraídos de óleos essenciais de origem vegetal, como o linalol, apresenta algumas limitações principalmente quanto à sua solubilidade e biodisponibilidade. Nesse sentido, sistemas de liberação de fármacos

podem constituir plataformas versáteis e alternativas para superar as desvantagens da administração de fitoquímicos, visando à melhoria de seus efeitos bioativos. Alguns agentes solubilizantes, como o dimetil sulfoxido (DMSO), por exemplo, geralmente melhoram a biodisponibilidade do linalol, mas também podem causar toxicidade celular e efeitos colaterais indesejáveis. Além disso, como composto volátil, o linalol é instável e tem meia-vida curta, o que restringe severamente sua aplicação clínica no futuro. Ademais, a natureza lipofílica do linalol confere baixa solubilidade em água. Para superar essas limitações, vários estudos recentes descreveram a complexação do linalol com ciclodextrinas (Koziol *et al.*, 2014; Rodríguez-López *et al.*, 2020).

As ciclodextrinas são estruturas supramoleculares caracterizadas pela formação de um anel, sendo as β -ciclodextrinas a forma mais comumente utilizada na liberação de fármacos. As β -ciclodextrinas têm formato de cones truncados e são compostas por sete unidades de glicopiranosídeos. Nos complexos de ciclodextrinas, a superfície externa hidrofílica confere solubilidade em água, e a cavidade interna hidrofóbica permite a inclusão de compostos lipofílicos como o linalol. Ademais, os sistemas de entrega em nanoescala também podem ser usados naturalmente para encapsular o linalol (Carneiro *et al.*, 2019).

A literatura científica descreve muitos exemplos do uso de nanopartículas lipídicas para superar os desafios envolvidos na entrega e liberação de compostos naturais, como flavonoides, polifenóis e carotenoides, que promovem importantes benefícios à saúde. As nanopartículas lipídicas possuem uma ampla gama de características importantes, como tamanho de partícula reduzido (entre 40 nm e 1000 nm), grande área superficial, alta capacidade de carga, possibilidade de liberação controlada do composto ativo, fácil produção em larga escala e, o mais importante, uma natureza biocompatível e biodegradável. Assim, o linalol se beneficia fortemente de sua carga em nanopartículas lipídicas, uma vez que essas partículas são capazes de superar as dificuldades físico-químicas do linalol (Carbone *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2018b).

3.2 Cálculos do *docking* molecular

O *docking* molecular é um dos métodos baseados em avaliação *in silico* mais difundidos e bem-sucedidos (Pinzi; Rastelli, 2019). Essa metodologia é de grande importância no planejamento e projeto de novos fármacos e visa prever o modo de ligação experimental e a afinidade de uma pequena molécula dentro do sítio de ligação do receptor-alvo de interesse (Guedes; Magalhães; Dardenne, 2014). Esse método, de modo geral, é inicialmente realizado prevendo-se o sentido molecular dos ligantes no receptor e, em seguida, usando-se uma função de pontuação para estimar sua complementaridade molecular (Pinzi; Rastelli, 2019). Atualmente, é usado como ferramenta computacional padrão no projeto de drogas, para otimização de compostos, e em estudos de triagem virtual, para encontrar novas moléculas biologicamente ativas (Guedes; Magalhães; Dardenne, 2014). A Tabela 2 mostra as energias resultantes das interações dos ligantes ATP (cocrystal com a ATP sintase) e do linalol.

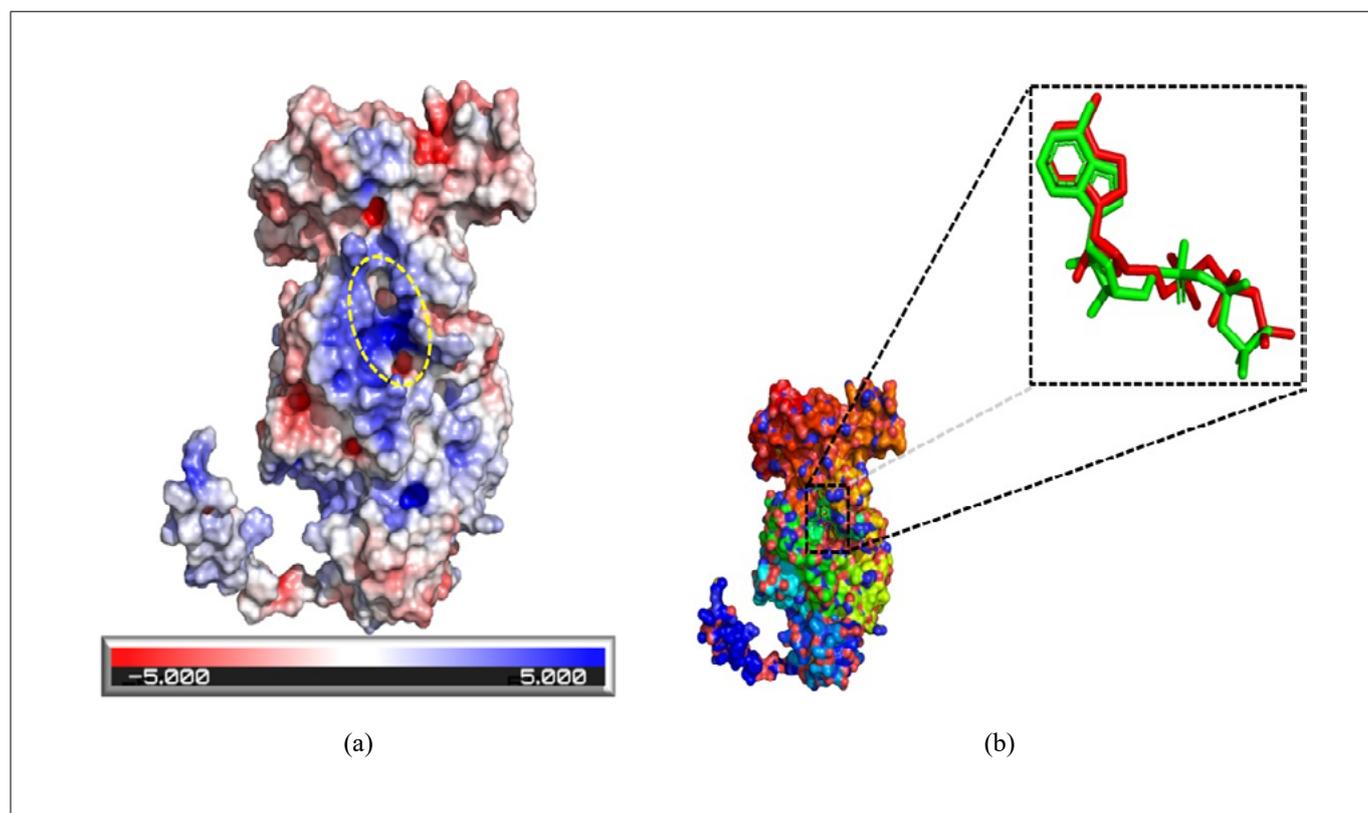
Tabela 2 ▼

Energias de ligação da enzima do PDB e do composto testado.
Fonte: dados da pesquisa

Enzima	Classificação	Energia de ligação (kcal/mol)	RMSD (Å)	Energia de ligação (kcal/mol)
				Linalol
Subunidade B da F ₁ F ₀ ATP sintase (6OQW)	Proteína de membrana	-8,30	0,89	-3,63

Figura 1 ▼
Subunidade B da ATP sintase.
(a) Ilustração mostrando em superfície eletrostática, no tracejado amarelo, a fenda de interação da ATP.
(b) Detalhe do cocrystal PDB em verde e a melhor conformação do *redocking* em vermelho.
Fonte: dados da pesquisa

Nesses experimentos, foi constatado que a ATP interage com a subunidade B da ATP sintase bacteriana, com energia de ligação próxima de $-8,30$ kcal/mol, o que foi verificado por meio do *redocking*, resultando em um RMSD de $0,89$ Å, demonstrando que o processo de validação foi bem sucedido, pois esse deve ser $\leq 2,0$ Å (Trott; Olson, 2010; Westermaier; Barril; Scapozza, 2015). Na Figura 1a, observa-se a superfície eletrostática da subunidade B da enzima, com o destaque do sítio de ligação da ATP eletropositivo em tracejado amarelo. Além disso, é possível verificar a sobreposição da molécula de ATP após o *redocking* no destaque da Figura 1b.



Estudos sobre a compreensão do modo de ação do linalol são necessários antes de sua aplicação como antimicrobiano no ambiente clínico. Até o momento, nenhum estudo relatou o modo de ação do linalol como agente antibacteriano. Estudos anteriores sobre óleos essenciais contendo linalol postularam sua capacidade de romper a membrana bacteriana (Yang *et al.*, 2019). No entanto, o mecanismo fundamental exato do linalol ainda não foi devidamente investigado. Dados obtidos a partir de análises proteômicas inferiram que o linalol induz estresse oxidativo em células de *K. pneumoniae*. O estresse oxidativo é conhecido por afetar a integridade das membranas celulares, em processo denominado de peroxidação lipídica – reação em cadeia autopropagada, que envolve reações entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e ácidos graxos de membrana, eventualmente destruindo a membrana da célula e, conseqüentemente, causando o extravasamento do conteúdo intracelular (Van Der Paal *et al.*, 2016; Wong-Ekkabut *et al.*, 2007).

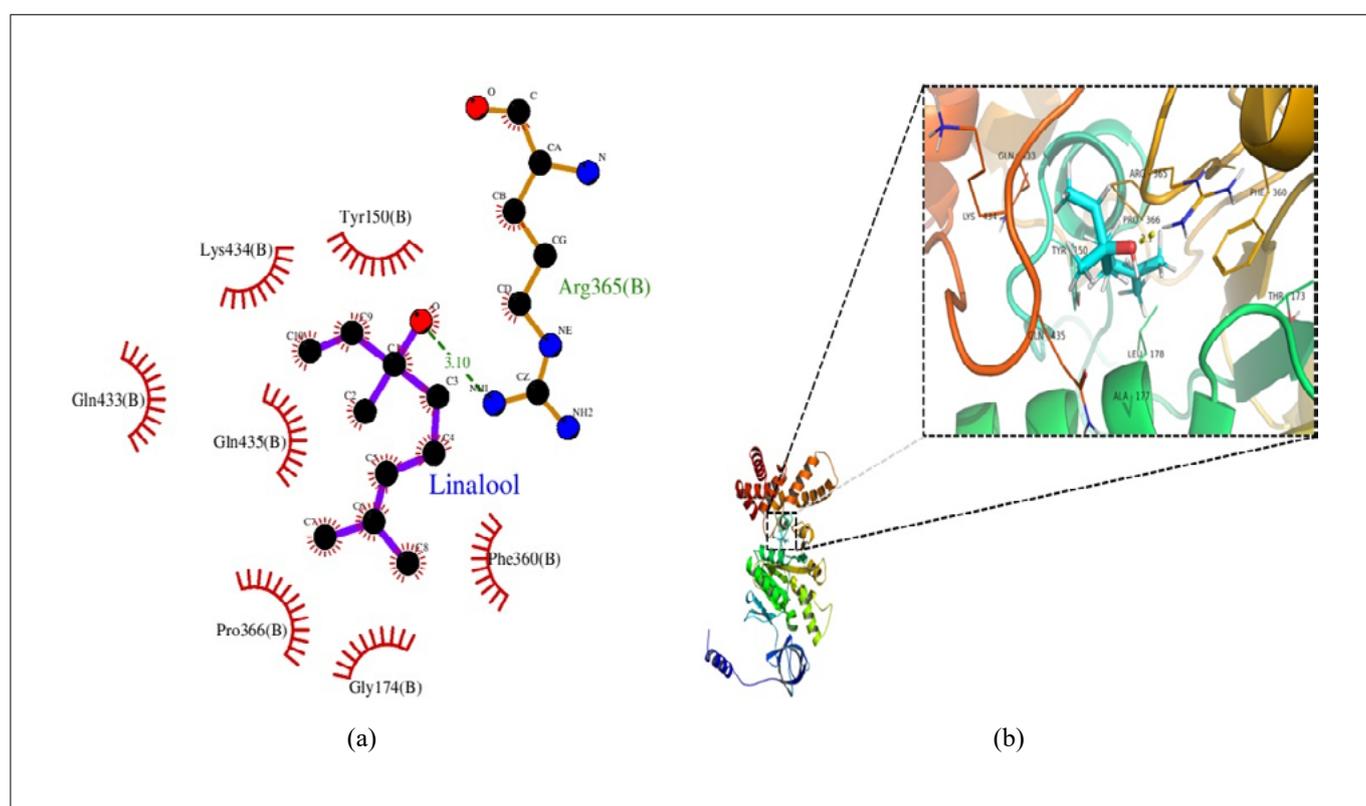
Neste estudo, o linalol foi capaz de interagir com o sítio de ligação da ATP na subunidade B da ATP sintase bacteriana, como mostrado na Figura 2. E como

Figura 2 ▼

Análise do *docking* molecular do linalol. (a) Interações bidimensionais do linalol com a subunidade B da ATP sintase. (b) Representação tridimensional das principais interações do linalol com o sítio ativo da ATP sintase, subunidade B.

Fonte: dados da pesquisa

se pode observar na Tabela 2, a energia de ligação do linalol é relativamente alta quando comparada à da ATP. No entanto, o linalol, sendo uma molécula de caráter majoritariamente hidrofóbico, foi capaz de formar sete interações de Van Der Waals e uma ligação de hidrogênio com aminoácidos do sítio ativo da enzima.

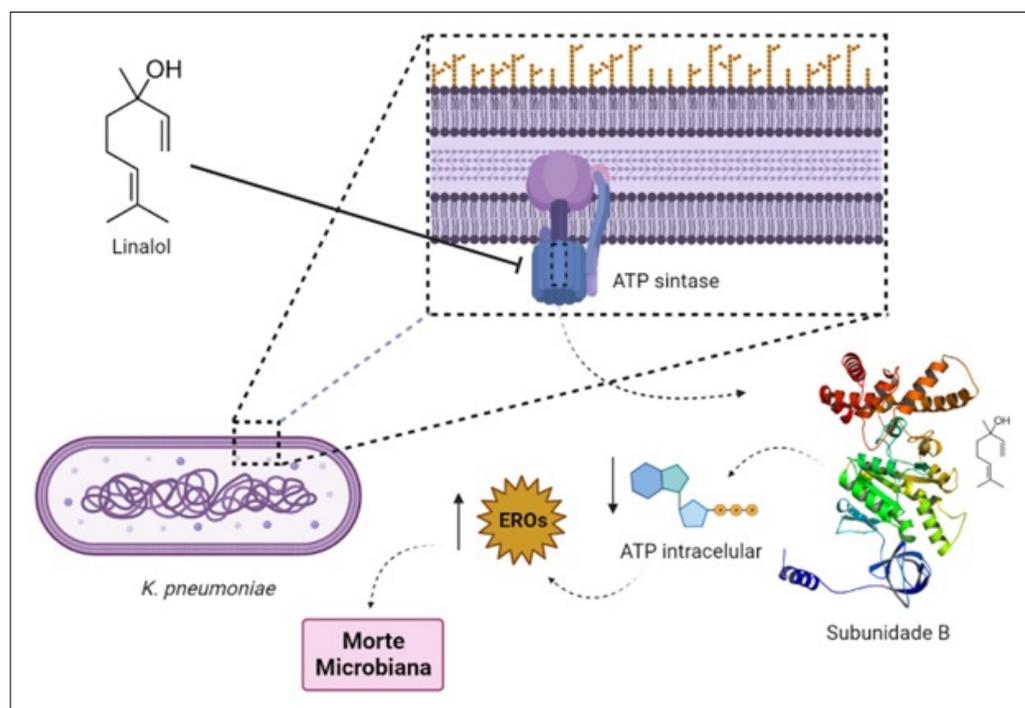


A adenosina trifosfato (ATP) está intimamente relacionada ao metabolismo energético, a diversas funções celulares e a atividades vitais (Bajpai *et al.*, 2013). A ATP sintase é uma das enzimas mais importantes para promover a produção e o metabolismo dependente de ATP. Sua principal propriedade é a de fornecer cofator e energia para as células, catalisando ADP em ATP (Pei *et al.*, 2019). O declínio na atividade da ATP sintase pode bloquear o metabolismo dos carboidratos, o que pode dificultar o crescimento celular e até levar a bactéria à morte (Lan *et al.*, 2019). Como demonstrado por Guo *et al.* (2021), a diminuição do nível de ATP em *P. fluorescens* tratada com linalol indicou que a atividade da ATP sintase foi bloqueada por esse fitoquímico. Esse fenômeno pode levar a uma diminuição no conteúdo de ATP bacteriano, afetando, assim, a atividade metabólica da bactéria – esses resultados correspondem aos da análise do potencial de membrana nos estudos de Lin *et al.* (2018) com *Listeria monocytogenes*. De maneira preditiva, neste estudo pode-se verificar que o linalol apresenta potencial para interagir com a ATP sintase bacteriana e possivelmente causar a morte de *K. pneumoniae*.

Sendo assim, os experimentos realizados neste trabalho demonstraram que o linalol apresenta efeito antibacteriano contra *K. pneumoniae* de caráter bactericida. Além disso, o mecanismo de ação desse fitoquímico foi explorado de maneira preditiva através do *docking* molecular, sugerindo provável inibição da ATP sintase bacteriana com uma K_i (constante inibitória) de 2,19 mM e consequente depleção da ATP intracelular e interrupção de diversos processos metabólicos vitais (Figura 3). No entanto, outras análises *in vitro* que visem o estudo mecanístico desse fitoquímico são indispensáveis, bem como estudos *in silico* de dinâmica molecular.

Figura 3 ►

Representação resumida do mecanismo de ação preditivo do linalol contra a ATP sintase de *K. pneumoniae* com base em resultados de testes *in vitro* e *docking* molecular. A molécula do linalol parece interferir em vários processos metabólicos vitais dependentes de ATP do microrganismo, causando acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, morte microbiana. Fonte: dados da pesquisa



4 Considerações finais

Em conclusão, pode-se verificar que o linalol teve atividade antibacteriana moderada contra *K. pneumoniae*, porém, de caráter bactericida. Além disso, o *docking* molecular indicou que o linalol foi capaz de interagir com a subunidade B da ATP sintase bacteriana e, possivelmente, prejudicar a síntese de ATP, induzindo, conseqüentemente, a morte microbiana. Outrossim, uma análise citotóxica precisará ser realizada para determinar os efeitos toxicológicos do linalol, especialmente em modelo animal, e isso provavelmente poderá agilizar a aplicação do linalol como antibacteriano no cenário clínico.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu financiamento externo.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Referências

AFONSO, L. S. R.; MILER-DA-SILVA, L. L.; GARRIDO, R. G. Estratégias terapêuticas para infecções por *Klebsiella pneumoniae* carbapenem resistente: uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, e46211730296, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i7.30296>.

AMINUL, P.; ANWAR, S.; MOLLA, M. M. A.; MIAH, M. R. A. Evaluation of antibiotic resistance patterns in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Bangladesh. **Biosafety and Health**, v. 3, n. 6, p. 301-306, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2021.11.001>.

AN, Q.; REN, J.-N.; LI, X.; FAN, G.; QU, S.-S.; SONG, Y.; LI, Y.; PAN, S.-Y. Recent updates on bioactive properties of linalool. **Food and Function**, v. 12, n. 21, p. 10370-10389, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1039/d1fo02120f>.

BAJPAI, V. K.; SHARMA, A.; BAEK, K.-H. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 582-590, 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.032>.

BENGOECHEA, J. A.; PESSOA, J. S. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 2, p. 123-144, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy043>.

BUENO-DUARTE, Y.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, S. C. Linalool effect on mitochondrial bioenergetics rat liver. **Vitae: Revista de La Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias**, Medellín, Colombia, v. 22, n. 1, p. 33-41, 2015. DOI: <https://dx.doi.org/10.17533/udea.vitae.v22n1a04>.

CARBONE, C.; MARTINS-GOMES, C.; CADDEO, C.; SILVA, A. M.; MUSUMECI, T.; PIGNATELLO, R.; PUGLISI, G.; SOUTO, E. B. Mediterranean essential oils as precious matrix components and active ingredients of lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 548, n. 1, p. 217-226, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.064>.

CARNEIRO, S. B.; DUARTE, F. Í. C.; HEIMFARTH, L.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; LIMA, Á. A. N. Cyclodextrin–drug inclusion complexes: in vivo and in vitro approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 642, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20030642>.

CHADHA, A.; MADYASTHA, M. Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. **Xenobiotica**, v. 14, n. 5, p. 365-374, 1984. DOI: <https://doi.org/10.3109/00498258409151425>.

CHASSAGNE, F.; SAMARAKOON, T.; PORRAS, G.; LYLES, J. T.; DETTWEILER, M.; MARQUEZ, L.; SALAM, A. M.; SHABIH, S.; FARROKHI, D. R.; QUAVE, C. L. A systematic review of plants with antibacterial activities: a taxonomic and phylogenetic perspective. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 586548, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.586548>.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 9th ed. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

EL-BAKY, R. M. A.; HASHEM, Z. S. Eugenol and linalool: comparison of their antibacterial and antifungal activities. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 44, p. 1869-1872, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8283>.

GUEDES, I. A.; MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, p. 75-87, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>.

GUO, F.; CHEN, Q.; LIANG, Q.; ZHANG, M.; CHEN, W.; CHEN, H.; YUN, Y.; ZHONG, Q.; CHEN, W. Antimicrobial activity and proposed action mechanism of linalool against *Pseudomonas fluorescens*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 562094, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.562094>.

GUO, H.; SUZUKI, T.; RUBINSTEIN, J. L. Structure of a bacterial ATP synthase. **eLife**, v. 8, e43128, 2019. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.43128>.

GWOREK, B.; KIJENSKA, M.; WRZOSEK, J.; GRANIEWSKA, M. Pharmaceuticals in the soil and plant environment: a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232, 145, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04954-8>.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1565\(200005/06\)11:3<137::aid-pca514>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1565(200005/06)11:3<137::aid-pca514>3.0.co;2-i).

HERMAN, A.; TAMBOR, K.; HERMAN, A. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. **Current Microbiology**, v. 72, p. 165-172, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0933-4>.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 6, p. 428-433, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9698631>.

KATIYAR, C.; GUPTA, A.; KANJILAL, S.; KATIYAR, S. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. **Ayu**, v. 33, n. 1, p. 10-19, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23049178/>. Acesso em: 17 jun. 2024.

KOLPA, M.; WAŁASZEK, M.; GNIADK, A.; WOLAK, Z.; DOBROŚ, W. Incidence, microbiological profile and risk factors of healthcare-associated infections in intensive care units: a 10 year observation in a Provincial Hospital in Southern Poland. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 15, n. 1, 112, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/ijerph15010112>.

KOZIOL, A.; STRYJEWSKA, A.; LIBROWSKI, T.; SALAT, K.; GAWEL, M.; MONICZEWSKI, A.; LOCHYNSKI, S. An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 14, p. 1156-1168, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.2174/1389557514666141127145820>.

KWIATKOWSKI, P.; SIENKIEWICZ, M.; PRUSS, A.; ŁOPUSIEWICZ, Ł.; ARSZYŃSKA, N.; WOJCIECHOWSKA-KOSZKO, I.; KILANOWICZ, A.; KOT, B.; DOŁĘGOWSKA, B. Antibacterial and Anti-Biofilm Activities of Essential Oil Compounds against New Delhi Metallo- β -Lactamase-1-Producing Uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* Strains. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, 147, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020147>.

LAN, W.; ZHANG, N.; LIU, S.; CHEN, M.; XIE, J. Epsilon-Polylysine inhibits *Shewanella putrefaciens* with membrane disruption and cell damage. **Molecules**, v. 24, n. 20, 3727, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24203727>.

LENCHENKO, E.; BLUMENKRANTS, D.; SACHIVKINA, N.; SHADROVA, N.; IBRAGIMOVA, A. Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. **Veterinary World**, v. 13, n. 1, p. 197-200, 2020. DOI: www.doi.org/10.14202/vetworld.2020.197-200.

LEVISON, M. E. Pharmacodynamics of antimicrobial drugs. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, n. 3, p. 451-465, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.04.012>.

LIN, L.; GU, Y.; LI, C.; VITTAYAPADUNG, S.; CUI, H. Antibacterial mechanism of ϵ -Poly-lysine against *Listeria monocytogenes* and its application on cheese. **Food Control**, v. 91, p. 76-84, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.025>.

MAHIZAN, N. A.; YANG, S.-K.; MOO, C.-L.; SONG, A. A.-L.; CHONG, C.-M.; CHONG, C.-W.; ABUSHELAIBI, A.; LIM, S.-H. E.; LAI, K.-S. Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. **Molecules**, v. 24, n. 14, 2631, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>.

MOO, C.-L.; OSMAN, M. A.; YANG, S.-K.; YAP, W.-S.; ISMAIL, S.; LIM, S.-H. E.; CHONG, C.-M.; LAI, K.-S. Antimicrobial activity and mode of action of 1,8-cineol against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Scientific Reports**, v. 11, 20824, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00249-y>.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100020>.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2008000200026>.

PEI, Q.; LI, Y.; GE, X.; TIAN, P. Multipath effects of berberine on peach Brown rot fungus *Monilinia fructicola*. **Crop Protection**, v. 116, p. 92-100, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.10.017>.

PEREIRA, I.; SEVERINO, P.; SANTOS, A. C.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. **Colloids and**

Surfaces B: Biointerfaces, v. 171, p. 566-578, 2018a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.001>.

PEREIRA, I.; ZIELINSKA, A.; FERREIRA, N. R.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. Optimization of linalool-loaded solid lipid nanoparticles using experimental factorial design and long-term stability studies with a new centrifugal sedimentation method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 549, n. 1-2, p. 261-270, 2018b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.068>.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 4331, 2019. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390/ijms20184331>.

PRAKASH, A.; VADIVEL, V.; RUBINI, D.; NITHYANAND, P. Antibacterial and antibiofilm activities of linalool nanoemulsions against *Salmonella Typhimurium*. **Food Bioscience**, v. 28, p. 57-65, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.018>.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, M. I.; MERCADER-ROS, M. T.; LUCAS-ABELLÁN, C.; PELLICER, J. A.; PÉREZ-GARRIDO, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, H.; YÁÑEZ-GASCÓN, M. J.; GABALDÓN, J. A.; NÚÑEZ-DELICADO, E. Comprehensive characterization of Linalool-HP- β -Cyclodextrin inclusion complexes. **Molecules**, v. 25, n. 21, 5069, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25215069>.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>.

SCHRÖDINGER, L.; DELANO, W. **PyMOL**: A molecular visualization system on an open source foundation, maintained and distributed by Schrödinger. 2020. Disponível em: <http://www.pymol.org/pymol>. Acesso em: 5 jul. 2022.

TAVARES, C. P. M. **Klebsiella pneumoniae e fatores associados que contribuem para a resistência antimicrobiana**: uma revisão de literatura. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/43230>. Acesso em: 1 ago. 2022.

THEURETZBACHER, U. Resistance drives antibacterial drug development. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 5, p. 433-438, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.07.008>.

THOMAS, B. T.; ADELEKE, A. J.; RAHEEM-ADEMOLA, R. R.; KOLAWOLE, R.; MUSA, O. S. Efficiency of some disinfectants on bacterial wound pathogens. **Life Science Journal**, v. 9, n. 2, p. 752-755, 2012. Disponível em: http://www.lifesciencesite.com/ljsj/life0902/111_9034life0902_752_755.pdf. Acesso em: 13 jul. 2022.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

VAN DER PAAL, J.; NEYTS, E. C.; VERLACKT, C. C. W.; BOGAERTS, A. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. **Chemical Science**, v. 7, p. 489-498, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5SC02311D>.

WESTERMAIER, Y.; BARRIL, X.; SCAPOZZA, L. Virtual screening: an *in silico* tool for interlacing the chemical universe with the proteome. **Methods**, v. 71, n. 1, p. 44-57, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.08.001>.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antibacterial agents in clinical development**: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. Geneva: WHO, 2017. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/258965>. Acesso em: 4 dez. 2022.

WONG-EKKABUT, J.; XU, Z.; TRIAMPO, W.; TANG, I.-M.; TIELEMAN, D. P.; MONTICELLI, L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 12, p. 4225-4236, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112565>.

WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 344-359, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>.

YANG, S.-K.; YUSOFF, K.; AJAT, M.; WEE, C.-Y.; YAP, P.-S.-X.; LIM, S.-H.-E.; LAI, K.-S. Combinatorial antimicrobial efficacy and mechanism of linalool against clinically relevant *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 635016, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.635016>.

YANG, S.-K.; YUSOFF, K.; THOMAS, W.; AKSEER, R.; ALHOSANI, M. S.; ABUSHELAIBI, A.; LIM, S.-H.-E.; LAI, K.-S. Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. **Scientific Reports**, v. 10, 819, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55601-0>.

YU, Y.; ANDREY, D. O.; YANG, R.-S.; SANDS, K.; TANSAWAI, U.; LI, M.; PORTAL, E.; GALES, A. C.; NIUMSUP, P. R.; SUN, J.; LIAO, X.; LIU, Y.-H.; WALSH, T. R. A *Klebsiella pneumoniae* strain co-harboring *mcr-1* and *mcr-3* from a human in Thailand. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 8, p. 2372-2374, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa133>.