

ANTONIO WILTON - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROPARTÍCULAS CONT



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA  
RENORBIO**

**ANTONIO WILTON CAVALCANTE FERNANDES**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
MICROPARTÍCULAS CONTENDO B-LAPACHONA E  
OXIMA DO LAPACHOL EM ISOLADOS CLÍNICOS DE  
*Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE.**

**RECIFE - PE  
2021**



**Universidade Federal Rural de Pernambuco**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO**

Antônio Wilton Cavalcante Fernandes

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO B-  
LAPACHONA E OXIMA DO LAPACHOL EM ISOLADOS CLÍNICOS DE  
*Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE.**

**RECIFE - PE**

**2021**

**ANTÔNIO WILTON CAVALCANTE FERNANDES**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO B-LAPACHONA E OXIMA DO LAPACHOL EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE.**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

**RECIFE-PE**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A635a FERNANDES, ANTONIO WILTON CAVALCANTE FERNANDES  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO ?-LAPACHONA E OXIMA DO  
LAPACHOL EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE. / ANTONIO  
WILTON CAVALCANTE FERNANDES FERNANDES. - 2021.  
97 f. : il.
- Orientador: MATEUS MATIUZZI DA COSTA.  
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede  
Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2021.
1. *Staphylococcus*. 2. Eudragit. 3. Sensibilidade colateral. 4. multiresistência. I. COSTA, MATEUS MATIUZZI  
DA, orient. II. Título

CDD 620.8

---

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela essência de estar vivo.

Aos MEUS PAIS (Laura e Argemiro) e aos meus IRMÃOS (Willian, Witalo e Welder) que sempre me apoiaram, contribuindo para minha formação pessoal e profissional.

Á MINHA ESPOSA, Erica Lavor, minha fonte de inspiração, que me ajudou a ter perseverança, calma e paciência quanto aos temas que me intrigavam durante a realização desta tese, além do apoio na conciliação entre minha rotina de trabalho e na confecção dos manuscritos.

Aos meus AMIGOS do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF, no campus de Ciências Agrárias, que estiveram comigo compartilhando momentos e conhecimentos a respeito do trabalho no laboratório. Acredito que todos os resultados são obtidos mediante a parceria que criamos ao longo dessa jornada.

Ao meu ORIENTADOR, professor Dr. Mateus Matiuzzi da Costa pelos conselhos, dicas, formação, experiências, amizade, além dos ensinamentos e organização das ideias durante a elaboração da tese. Sei que houve um período de “ausência” da minha parte, mas em nenhum momento eu deixei o compromisso que fizemos quando decidimos começar o desenvolvimento dos objetivos. Agradeço muito a compreensão e o aprendizado que tivemos e teremos nas parcerias que a vida nos oferece.

A minha CORIENTADORA, professora Dr(a) Cleonia Roberta Melo Araujo e ao Grupo de Química Aplicada a Farmácia (GQAF) por disponibilizarem as substâncias que permitiram o desenvolvimento desta pesquisa, bem como pela disponibilidade em tirar dúvidas a respeito da produção destas.

Ás PROFESSORAS Larissa Rolim (UNIVASF), Xirley Nunes (UNIVASF) e Ana Paula (UNIVASF) pelas considerações feitas na qualificação e que contribuíram, MUITO, na construção deste trabalho.

Á CAPES e a FACEPE pela contribuição no desenvolvimento e manutenção da ciência no Brasil, permitindo, assim, o estímulo à pesquisa, a publicações, a capacitação em eventos científicos.

*A missão do professor não é dar respostas prontas.  
As respostas estão nos livros, estão na internet.  
A missão dos professores é provocar a inteligência, é provocar o espanto, a  
curiosidade.*

*Rubem Alves*

## RESUMO

A saúde única abrange áreas do conhecimento voltadas para isolar micro-organismos patogênicos e multirresistentes, além de buscar alternativas terapêuticas para controle e erradicação de doenças infecciosas. As bactérias do gênero *Staphylococcus*, nesse contexto, são consideradas um desafio da saúde humana e animal em virtude da seleção de isolados resistentes à terapia antimicrobiana. A utilização e o aperfeiçoamento de compostos de origem natural ou sintética têm sido importante para o controle da patogenicidade bacteriana. A combinação de drogas, bem como a microencapsulação estão entre as estratégias para o desenvolvimento de compostos com atividade antimicrobiana. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana da  $\beta$ -lapachona e da Oxima do lapachol na supressão da resistência em *Staphylococcus aureus* metilicina resistente. Inicialmente foi realizado um levantamento bibliográfico a respeito da relação entre a multirresistência e a saúde única. A determinação da atividade antimicrobiana das substâncias foi determinada por meio do método de microdiluição, no qual foram utilizados isolados clínicos de humanos (n= 3) e animais (n= 7), incluindo a ATCC25923, com características de multirresistência. As partículas de Eudragit® contendo  $\beta$ -lapachona e oxima do lapachol apresentam atividade antimicrobiana em todos os isolados. No teste de sinergismo, pelo método do *Checkerboard*, houve um aumento da potência dos antimicrobianos a partir da análise de redução (aproximadamente 96%) da concentração inibitória mínima. Na interferência fenotípica da bomba de efluxo, apesar da pouca atividade na redução da concentração inibitória mínima (CIM) do brometo de etídeo, a oxima do lapachol, por sua vez, apresentou atividade intrínseca de interação com a proteína (1PW4) mais significativo (Energia livre: -91 kJ/mol), que o próprio inibidor, carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona, sugerindo que sua atividade possui ingerência com o mecanismo de resistência. A análise *in silico* permitiu uma compreensão do possível mecanismo de interação intermolecular entre as substâncias e as proteínas-alvo. Diante disso, o estudo sugere, então, que a redução da CIM dos antimicrobianos, no sinergismo, bem como a análise de interferência fenotípica da bomba de efluxo pelas substâncias, permitem inferir a importância da  $\beta$ -lapachona e da Oxima do lapachol como moléculas promissoras no tratamento de infecções causadas por micro-organismos multirresistente no contexto da Saúde Única.

**Palavras chave:** *Staphylococcus*, Eudragit, Sensibilidade colateral, multiresistência.

## ABSTRACT

One Health encompasses areas of knowledge aimed at isolating pathogenic and multi-resistant microorganisms, in addition to seeking therapeutic alternatives for the control and eradication of infectious diseases. *Staphylococcus* bacteria, in this context, are considered a challenge for human and animal health due to the selection of isolates resistant to antimicrobial therapy. The use and improvement of compounds of natural or synthetic origin have been important for the control of bacterial pathogenicity. The combination of drugs, as well as microencapsulation, are among the strategies for the development of compounds with antimicrobial activity. Thus, the objective of the study was to evaluate the antimicrobial activity of  $\beta$ -lapachone and lapachol Oxima in the suppression of resistance in resistant methicillin *Staphylococcus aureus*. Initially, a bibliographic survey was carried out regarding the relationship between multidrug resistance and unique health. The determination of the antimicrobial activity of the substances was determined using the microdilution method, in which clinical isolates from humans ( $n = 3$ ) and animals ( $n = 7$ ), including ATCC25923, with multidrug resistance characteristics were used. Eudragit® particles containing  $\beta$ -lapachone and lapachol oxime have antimicrobial activity in all isolates. In the synergism test, using the Checkerboard method, there was an increase in the potency of antimicrobials from the analysis of reduction (approximately 96%) of the minimum inhibitory concentration. In the phenotypic interference of the efflux pump, despite the little activity in reducing the minimum inhibitory concentration (MIC) of ethidium bromide, lapachol oxime, in turn, showed the most significant intrinsic activity with the protein (1PW4) free: -91 kJ / mol), than the inhibitor itself, carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone, suggesting that its activity has interference with the resistance mechanism. The silica analysis allowed an understanding of the possible mechanism of intermolecular interaction between the substances and the target proteins. Therefore, the study suggests, then, that the MIC reduction of antimicrobials, in synergism, as well as the analysis of phenotypic interference of the efflux pump by the substances, allow to infer the importance of  $\beta$ -lapachone and Lapachol Oxima as promising molecules in the treatment of infections caused by multidrug-resistant microorganisms in the context of One Health.

**Keywords:** *Staphylococcus*, Eudragit, Collateral Sensitivity, multiresistance.



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1. GERAL.....	10
2.2. ESPECÍFICOS.....	10
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
3.1 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> RESISTENTES A METICILINA.....	11
3.2 O BIOFILME.....	11
3.2.1 MECANISMOS DE FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	12
3.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	14
3.3.1 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS.....	14
3.4 NAFTOQUINONAS.....	15
3.5 NANOTECNOLOGIA.....	16
<b>4. CAPÍTULO 1 - RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E SAÚDE ÚNICA NO CONTEXTO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i></b> .....	<b>19</b>
<b>5. CAPÍTULO 2 - O USO DA METODOLOGIA DO <i>CHECKERBOARD</i> PARA SELECIONAR COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS</b> .....	<b>30</b>
<b>6. CAPÍTULO 3: B-LAPACHONA E OXIMA DO LAPACHOL NA INTERFERÊNCIA FENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA POR BOMBA DE EFLUXO EM <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i></b> .....	<b>51</b>
<b>7. CAPÍTULO 4 - EFEITO SINÉRGICO, DESIGN <i>IN SÍLICO</i> E NANOENCAPSULAMENTO DA B-LAPACHONA E OXIMA DO LAPACHOL NA SUPRESSÃO DA RESISTÊNCIA EM MRSA</b> .....	<b>68</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>87</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>93</b>
<b>CAPÍTULO 2 – “THE USE OF THE CHECKERBOARD METHOD TO SELECT ANTI-MICROBIAL COMPOUNDS”.....</b>	<b>93</b>
<b>CAPÍTULO 3 – B-LAPACHONE AND LAPACHOL OXIMA ON PHENOTYPIC RESISTANCE INTERFERENCE BY EFFLUX PUMP IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....</b>	<b>94</b>
<b>CAPÍTULO 4 – SYNERGISTIC EFFECT, SILICA DESIGN AND NANOENCAPSULATION OF B-LAPACHONE, LAPACHOL OXIME IN THE SUPPRESSION OF RESISTANCE IN MRSA.....</b>	<b>95</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre as mais prevalentes (ALGAMMAL et al. 2020). Estas bactérias começaram a apresentar resistência a diversas terapias, como a formação de biofilme, expressão de bomba de efluxo, dentre outras (AKINDOLIRE et al., 2015). A produção do biofilme em *Staphylococcus* spp. é o principal fator de patogenicidade, bem como a resistência aos antimicrobianos, já que as células, devidamente organizadas, ficam protegidas por uma matriz polimérica evitando a entrada dos fármacos e de proteínas de defesa do sistema imune, garantindo a proteção da comunidade (ARCHER et al., 2011; LÓPEZ et al., 2010).

A utilização de novos compostos de origem natural ou sintética possibilitam alternativas para a redução da patogenicidade bacteriana em diferentes situações clínicas. Estes compostos podem ter ação tanto antimicrobiana como imunomodulatória, além da ação sobre a expressão de genes envolvidos na formação do biofilme (COS et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016).

Diante disso, a síntese de novos compostos para desenvolvimento de substâncias conduziu a um aumento do interesse na “redescoberta” dos produtos naturais. A veemente necessidade por novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas, câncer, dentre outras, aumentou a demanda para descoberta de novos compostos terapêuticos, sendo os produtos naturais a opção mais favorável (CRAGG e NEWMAN, 2013; TAYLOR, 2013; UPADHYAY et al., 2014).

Além do mais, a combinação de diferentes substâncias aumenta as chances de sucesso no controle da infecção. Os usos de extratos de plantas bioativas, derivados semissintéticos e compostos puros isolados aumentam a eficácia *in vitro* de antimicrobianos utilizados contra uma variedade de micro-organismos (STEFANOVIC; STANOJEVIC; OMIC, 2012).

O desenvolvimento de sistemas de liberação, por sua vez, possibilita o melhoramento da atividade dos produtos naturais, pois permite um aumento na área superficial, além de exibir propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas peculiares (AGNIHOTRI, SOPPIMATH et al., 2010). A união de diversas áreas do conhecimento, incluindo a nanotecnologia e a otimização dos recursos naturais melhora as propriedades cinéticas e dinâmicas de compostos promissores a “novos fármacos” (DETSI et al., 2020).

Alguns materiais, como os polímeros de Eudragit<sup>®</sup>, têm sido estudados com o objetivo de permitir, por exemplo, a liberação controlada de substâncias e assim, melhorar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico (BHILEGAONKAR e PARVATKAR, 2020).

Portanto, as perspectivas relacionadas encapsulamento de compostos antimicrobianos podem contornar a crescente onda de resistência bacteriana. O efeito sinérgico desses compostos dificulta a seleção de isolados resistentes, permitindo tratamentos mais eficazes no controle de infecções causadas por micro-organismos patogênicos, como o MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de micropartículas contendo  $\beta$ -lapachona e oxima do Lapachol em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* metilina resistente.

### 2.2. Específicos

- Correlacionar o contexto dos mecanismos de resistência com o conceito da *One Health* (saúde única).
- Obter micropartículas contendo  $\beta$ -lapachona e oxima do lapachol.
- Determinar a concentração antimicrobiana da  $\beta$ -lapachona e oxima do lapachol nas partículas de Eudragit® E 100.
- Verificar a existência de interferência dos compostos com o sistema de bomba de efluxo em *Staphylococcus aureus*.
- Determinar o efeito sinérgico entre os compostos e os fármacos antimicrobianos pelo método de *Checkerboard*, bem como padroniza-lo.
- Caracterizar a interação dos compostos testados com alvos bacterianos.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina

Os *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina - MRSA são bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp.. Elas são consideradas um problema de saúde mundial em virtude no número crescente de infecções hospitalares. Além disso, são micro-organismos com alta capacidade de adquirir resistência às drogas antimicrobianas. Característica que teve início com a utilização da Penicilina, um antimicrobiano  $\beta$ -lactâmicos e o primeiro a ser utilizado na terapia contra *Staphylococcus* spp. (ALTIERI et al., 2013). Com o aparecimento de isolados resistentes, surgiram a Meticilina e a Oxacilina a partir de modificações moleculares nos  $\beta$ -lactâmicos, a fim de permitir um controle dos casos de infecções nos hospitais (ATIQUÉ et al., 2012).

Contudo o uso indiscriminado de antimicrobianos na terapêutica profilática humana e veterinária tem favorecido a pressão seletiva, resultando em espécies bacterianas cada vez mais resistentes e gerando os isolados conhecidos como MRSA. Além dessa característica de multirresistente esses micro-organismos possuem a capacidade de adesão a uma variedade de substratos, formando, assim, o biofilme (ATIQUÉ et al., 2012).

Outro fator relevante é que a utilização de antimicrobianos na prática clínica causa um impacto negativo nos tratamentos, gerando falhas nas terapias aplicadas às doenças bacterianas de origem animal, como a mastite (CAMPERIO et al., 2017). O que se observa é que inflamação na glândula mamária, cuja etiologia é *Staphylococcus* spp. torna um grande problema, pois persiste em infecções crônicas, em que mesmo com tratamento se tornam recorrentes (GOMES; SAAVEDRA; HENRIQUES, 2016).

Verifica-se que a formação do biofilme ainda é considerada uma das principais formas de patogênese. Isso é importante, principalmente, quando nos referimos à utilização de antimicrobianos para o controle e erradicação das infecções causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* (PAHARIK e HORSWILL, 2016; PARK et al., 2012).

#### 3.2 O Biofilme

O biofilme constitui um mecanismo de virulência para a sobrevivência bacteriana. Estima-se que aproximadamente 80% das infecções em humanos podem ser

causadas por bactérias formadoras de biofilme. Várias doenças podem ser atribuídas a essa estrutura, como otites, vaginites, conjuntivites, uretrites, dentre outras. De uma forma geral, é formada por uma comunidade de células protegidas por uma matriz de exopolissacarídeo. Esta confere proteção contra substâncias antimicrobianas, células e proteínas do sistema imune do hospedeiro (VERDEROSA, TOTSIKA e FAIRFULL-SMITH 2019).

Na estrutura do biofilme coexistem diversas células e clones que conferem um padrão de resistência na colônia apesar da diversidade. Estes clones, apesar de serem geneticamente idênticos, são resistentes à maioria dos antimicrobianos, provavelmente devido à expressão de toxinas e antitoxinas, que prejudicam o mecanismo de ação (LÓPEZ et al., 2010).

Na formação do biofilme os micro-organismos crescem aderidos a uma superfície, constituindo um complexo de células unidas por uma matriz extracelular. Essa matriz permite a nutrição da comunidade a partir da absorção de nutrientes, como carbono, nitrogênio, fosfato, além da proteção da colônia (ARCHER et al., 2011).

Além disso, as condições de hipóxia e déficit nutricional, por exemplo, são fatores diretamente relacionados com o padrão fenotípico das bactérias. Isso resulta em uma baixa atividade metabólica e taxa de divisão celular, além da barreira que o biofilme proporciona, dificultando a atuação dos antimicrobianos no interior dessa estrutura (ARCHER et al., 2011). Além do mais, existem hipóteses de que outros micro-organismos presentes na matriz polimérica agravam o quadro infeccioso e, conseqüentemente, o tratamento (RIBEIRO et al., 2016).

Em ambiente laboratorial, o processo de formação do biofilme se assemelha à fase estacionária de crescimento bacteriano, ou seja, a bactéria passa por mudanças metabólicas, tal como síntese de substâncias com propriedades antimicrobianas, pigmentos e moléculas de baixa massa molecular. Estes metabólitos podem ter como função a sinalização celular para iniciar a formação do biofilme (LÓPEZ et al., 2010).

### **3.2.1 Mecanismos de Formação do Biofilme**

Os mecanismos de formação do biofilme, bem como sua desestabilização podem ser gerados a partir de diversos fatores, incluindo ativação do sistema *quorum-sensing*, liberação de proteases e DNase, ácido *cis*-2-decenóico, *D*-aminoácidos (*D*-leucina, *D*-metionina, *D*-tirosina e *D*-triptofano) peptídeos solúveis em fenol, íons e mudanças de pH (RIBEIRO et al., 2016; PARK et al., 2012).

De início ocorre uma sobreposição de mucopolissacarídeos, ácido teicóico e proteínas do hospedeiro. O *Polysaccharide Intercellular Antigen* (PIA) é o principal componente do biofilme, sendo composto de resíduos de N-acetilglicosamina (80-85%). Este polissacarídeo é expresso na presença de algumas substâncias como glicose, glucosamina, ácido oleico, concentrações sub-inibitórias de alguns antimicrobianos, ureia, anaerobiose, concentrações de Ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ), osmolaridade, altas temperaturas e o etanol (ARCIOLA et al., 2015).

A presença do PIA na composição do biofilme é essencial para a manutenção das células na matriz polimérica. O cultivo em meio ágar vermelho congo, por exemplo, permite diferenciar bactérias PIA-positiva (colônias enegrecidas) e PIA-negativa. O processo de hemaglutinação também está envolvido na produção do PIA, sendo, por sua vez, uma análise qualitativa para verificar a produção deste polímero (ARCIOLA et al., 2015; BÜTTNER et al., 2015).

De uma forma geral, as etapas da formação do biofilme são: ligação ou adesão, crescimento ou maturação, e disseminação ou desestabilização. Na primeira a bactéria planctônica adere a uma superfície, em seguida ocorre à maturação de uma estrutura composta de células com diferentes padrões fenotípicos e genotípicos. Na segunda etapa ocorrem processos relacionados aos aspectos morfológicos, a motilidade, a expressão gênica e a sobrevivência das células, além da secreção de substâncias, como o ácido teicóico, principalmente por *Staphylococcus* spp. O último estágio do biofilme é o destacamento e dispersão das bactérias. Microcolônias também podem se destacar da matriz polimérica e chegar aos fluidos corporais, semelhante ao processo de metástase das células cancerosas, infectando outras regiões do hospedeiro (BÜTTNER et al., 2015).

As células que compõe o biofilme podem constituir subpopulações fenotipicamente distintas, a exemplo de outras bactérias e alguns tipos de fungos. Isso é causado devido à expressão de genes distintos. Tal fenômeno é dependente das condições extracelulares como, nutrientes, oxigênio, que criam um microambiente para o desenvolvimento das células (ARCHER et al., 2011; LÓPEZ et al., 2010; RIBEIRO et al., 2016).

No biofilme de *S. aureus* existe uma região aeróbica na superfície. Acredita-se que parte do biofilme é inativo metabolicamente (LÓPEZ et al., 2010). Esse estado fisiológico das células que compõe o biofilme pode ser monitorado pela análise da expressão de genes específicos a fim de definir as subpopulações que compõe o biofilme (ARCHER et al., 2011).



### 3.3 Resistência aos Antimicrobianos

O aumento de casos referentes a micro-organismos multirresistentes a terapia antimicrobiana e à contínua ênfase sobre os custos dos cuidados com a saúde tem chamado o interesse de muitos cientistas. Esses buscam metodologias, bem como desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, que superem as resistências e sejam eficazes em termos de custos hospitalares (SOO-HWAN, 2011).

As infecções relacionadas à assistência a saúde, por exemplo, elevam os custos hospitalares, já que altas doses de antimicrobianos são utilizadas para erradicar infecções. Isso é reflexo não só do tratamento errado, como também do período de internação. Diante disso, as infecções causadas por micro-organismos multi-resistentes estão entre os gastos mais elevados, devido ao caráter multidimensional, muitas vezes associado à utilização de antimicrobianos de última geração. Penicilinas, aminoglicosídeos e cefalosporinas estão entre as classes mais utilizadas (LEONCIO, et al., 2019).

O aparecimento de resistência á penicilina, á oxacilina, á clindamicina e á Vancomicina, por serem os principais antimicrobianos utilizados na prática clínica contra infecções causadas por *Staphylococcus* spp. gera um grande desafio na saúde. Daí a importância de testes adicionais para o diagnóstico laboratorial da resistência, a fim de permitir uma terapêutica mais efetiva (MIMICA, 2012).

Logo, diversas ações estão sendo direcionadas para prevenir, desestabilizar a matriz polimérica, enfraquecer o sistema de comunicação bacteriana (*quorum-sensing*) ou mesmo matar a comunidade microbiana formadora do biofilme. Os compostos de origem natural ou sintética estão ganhando destaque no controle da patogenicidade causada por isolados produtoras de biofilme em diferentes situações clínicas. Estes compostos podem ter ação tanto antimicrobiana como imunomodulatória, além da ação sobre a expressão de genes envolvidos na formação do biofilme (RIBEIRO et al., 2016).

#### 3.3.1 Alternativas Terapêuticas

Os produtos naturais estão entre alternativas terapêuticas no mercado farmacêutico. Eles garantem apoio à pesquisa acadêmica e às organizações públicas envolvidas na preservação dos recursos naturais. O uso do conhecimento etnofarmacológico possibilita uma diminuição das ideias empíricas e aumenta a probabilidade de sucesso no desenvolvimento de novos fármacos (TAYLOR, 2013).

Em consonância com a descoberta de novos fármacos, tem-se que a combinação entre substâncias com potencial antimicrobiano, a exemplo dos produtos naturais (metabólitos secundários) e antimicrobianos usuais, está entre as expectativas para o âmbito farmacêutico mundial. As vantagens incluem: o aumento do espectro de ação do antimicrobiano, a redução da toxicidade, o uso de baixas doses e, conseqüentemente, a prevenção da seleção de bactérias resistentes durante a terapia (RIBEIRO et al., 2016).

A síntese de novos compostos químicos aumentou o interesse da indústria farmacêutica juntamente com o melhoramento dos processos de síntese química na busca por alternativas terapêuticas no tratamento de doenças microbianas. A necessidade por novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas, câncer, dentre outras, aumentou a demanda para utilização de produtos naturais como a alternativa no desenvolvimento da pesquisa desses compostos (CRAGG e NEWMAN, 2013; UPADHYAY et al., 2014).

Os produtos naturais, dessa forma, oferecem a possibilidade de desenvolvimento de medicamentos de interesse na saúde (BARREIRO e BOLZANI, 2009). No Brasil, as pesquisas proporcionam o envolvimento multidisciplinar e o desenvolvimento tecnológico nacional (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

### 3.4 Naftoquinonas

As quinonas são grupos *carbonílicos* conjugados em um anel de seis membros com dois elétrons oxidativos, produtos do diol aromático. Em geral exibe dois tipos de reações com os sistemas biológicos: primeiro, agem como transferidores de elétrons, reduzindo o NADPH, gerando radicais superóxido e peróxido de hidrogênio; segundo, agem como eletrófilos, formando ligações covalentes com grupos nucleofílicos funcionais em moléculas bioativas. Isso permite reações radicalares com formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's). Nesta classe as naftoquinonas se destacam por causa da ocorrência em produtos naturais e em poluentes atmosféricos (FERREIRA et al., 2010; KUMAGAI et al., 2012).

As naftoquinonas pertencem a classe das quinonas, relacionadas ao sistema naftalênico. Estas, por sua vez, são compostos orgânicos que interagem com diversas funções nos sistemas biológicos, a exemplo do processo inflamatório, ações antitumorais, indução de toxicidade por meio da formação de ligações covalentes e participam da transferência de elétrons em reações de óxido-redução (FERREIRA et al., 2010).

Essas naftoquinonas apresentam inúmeras atividades antimicrobinas, anti-inflamatória, antimalária, tripanocidas e anticancerígenas (ARAÚJO, ALENCAR e NETO, 2002), bem como fotoprotetora, em relação à oxima do lapachol (ARAÚJO et al., 2014; FERREIRA et al., 2010). A grande variedade estrutural tem despertado o interesse dos cientistas, devido a atuação em múltiplas funções biológicas (FERREIRA et al., 2010).

O lapachol, 2-hidroxi-3(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona, é extraído do cerne de plantas da família Bignoniaceae, do gênero *Tabebuia* conhecida popularmente como ipê. Esse e outros compostos estão sendo modificados com o objetivo de potencializar a atividade biológica. A beta-lapachona e oxima do lapachol, utilizadas no desenvolvimento deste trabalho, foram sintetizadas a partir da catálise ácida (ácido sulfúrico/ 0 °C), para a beta, e adição, ao lapachol, de  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  em solução etanólica acidificada, para a oxima (ARAÚJO et al., 2014).

Diante do exposto, os produtos naturais vêm se mostrando promissores para a indústria farmacêutica como fonte de novas moléculas bioativas. Essas ainda podem ser importantes do ponto de vista para inspiração de novos fármacos, quando nos referimos à química farmacêutica e medicinal. Isso só reforça o estímulo aos estudos a fim de proporcionar novos tratamentos para inúmeras doenças emergentes e re-emergentes.

### **3.5 Nanotecnologia**

Alternativa para melhorar a atividade dos produtos naturais é a utilização da nanotecnologia. Essa é caracterizada pela manipulação e exploração de materiais na ordem 1-100 nm. Isso permite um aumento na área superficial, além de exibir propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas peculiares. Além do mais apresenta como vantagem aplicação em diversas áreas, como farmacêutica, ciências dos materiais, microbiológica, oferecendo, assim, perspectivas para aperfeiçoar a qualidade de vida (AGNIHOTRI, SOPPIMATH et al., 2010).

A técnica de encapsulação consiste na incorporação de compostos em uma matriz formando um micro ou nano sistema. Esse processo possibilita a proteção de compostos instáveis e/ou voláteis, liberação controlada, controle das características organolépticas, bem como aumento da hidrofiliabilidade. Para isso existem algumas técnicas de nanoencapsulação e microencapsulação. Na nanoencapsulação envolve etapas de emulsificação e evaporação do solvente, incluindo fases de complexação e

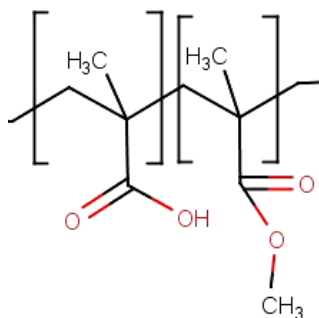
nanoprecipitação de compostos com características hidro ou lipofílicas. A microencapsulação, por sua vez, inclui técnicas químicas, físico-químicas e físico-mecânicas, que compreendem ações de secagem, pulverização, emulsificação, revestimento, evaporação, polimerização e aprisionamento de lipossomas (DETSI et al., 2020).

Diante disso, diversos materiais (lipossomas, micelas, nanoesferas, micropartículas, partículas lipídicas sólidas e nanotubos de carbono) têm sido estudados com o objetivo de permitir a liberação controlada de substâncias e assim melhorar o perfil farmacocinético e, conseqüentemente, farmacodinâmico. Logo o objetivo básico é controlar a liberação de um determinado fármaco e permitir uma terapia mais efetiva, eliminando possíveis problemas relacionados à dose, por exemplo. Além disso, permite a manutenção das concentrações da droga e redução da quantidade de administrações. (LETCHFORD e BURT, 2007; NIKAM et al., 2011).

Diversos materiais têm sido utilizados como veículos de compostos com ação antimicrobiana. Na medicina humana os nanomateriais, materiais com dimensões entre 1-100 nm, ganharam destaque como distribuidores de compostos ativos e mais recente, como “armas” químicas no tratamento de infecções por micro-organismos multirresistentes. Acredita-se que o alvo principal da utilização destes compostos seja a membrana das bactérias e, após a internalização da substância carreadora, permita uma alteração nas vias de transdução de sinais bioquímicos, dificultando mutações ou seleção de micro-organismos resistentes (ARUGUETE et al., 2013).

O Eudragit® (**Figura 1**) é um polímero de acrilato de etil, metil meta-acrilato contendo um grupamento ácido-éster metacrílico. Possui aproximadamente 125 kDa. Solubilidade em compostos orgânicos, como metanol, etanol, solução aquosa de álcool isopropílico e acetona a 3% (BHILEGAONKAR e PARVATKAR, 2020; SONJE e CHANDRA, 2013; KIM, et al., 2020).

Em relação as propriedades do Eudragit é um polímero com diversos perfis de solubilidade que permite a liberação de fármacos no intestino, evitando a possível degradação desses quando em contato com o pH estomacal. Algumas preparações, a partir desse polímero, são conhecidas como “de liberação retardada”, que aumentam a eficiência de terapias convencionais (KIM, et al., 2020).



**Figura 1:** Polímero de Eudragit (adaptado de KIM, et al., 2020).

Outras importantes funções deste polímero são evitar a degradação pela umidade, melhorar parâmetros organolépticos e aderência pelo paciente. Portanto, com estas variedades de aplicações, os polímeros de Eudragit<sup>®</sup> possuem uma grande significância para estudos envolvendo sua utilização para melhorar a ação de drogas de interesse farmacológico (BHILEGAONKAR e PARVATKAR, 2020).

Dentre as aplicações desse polímero podemos listar: carreadores de drogas oftalmológicas, administração por diferentes vias (enteral, transdérmica, vaginal), terapia genética e produção de vacinas. Isso mostra a importância do material no tratamento de uma variedade de doenças, incluindo infecções graves, como àquele cujo agente etiológico é o *S. aureus* (SONJE e CHANDRA, 2013).

A ação antimicrobiana de várias nanoestruturas tem sido investigada com o objetivo de compreender as propriedades de alguns compostos. O mecanismo de ação ainda é desconhecido, a justificativa da utilização está centrada nas propriedades físico-químicas das micropartículas, como área superficial, permeabilidade seletiva de membrana plasmática e forças intermoleculares. Os estudos sugerem que os resultados da atividade antimicrobiana de compostos nanoencapsulados são relevantes para ação antibacteriana de alguns metais, como zinco e prata, contra uma variedade de microorganismos, a exemplo do *Staphylococcus aureus* (SEIL e WEBSTER, 2012).

#### 4. CAPÍTULO 1 - Resistência antimicrobiana e saúde única no contexto da produção de biofilme por *Staphylococcus aureus*

**Antonio Wilton Cavalcante Fernandes<sup>1</sup>; Erica Martins de Lavour<sup>1</sup>; Edilson do Carmo Marins Júnior<sup>2</sup>; Mateus Matiuzzi da Costa<sup>3</sup>**

*1 - Mestre Biociências da Universidade Federal do Vale do São Francisco.*

*2 – Acadêmico de Biologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco.*

*3 - Professor Associado do colegiado de Zootecnia da Universidade Federal do Vale do São Francisco.*

##### **Resumo**

As bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. utilizam diversos fatores de virulência para dificultar a ação de drogas antimicrobianas, como formação biofilme, toxinas, enzimas, bomba de efluxo. Dentre essas, o biofilme constitui um importante fator de sobrevivência bacteriana, pois confere proteção contra antimicrobianos, sistema imunológico e impasses do meio. A formação e diversidade dessa estrutura favorecem a comunidade bacteriana. Por outro lado, o biofilme prejudica a terapêutica das drogas antibióticas levando ao agravamento dos quadros de infecção tanto do ponto de vista da medicina humana, como veterinária. Nesse contexto, a *One Health* possibilita que profissões de diversas áreas de conhecimento interajam para fortalecer a vigilância à saúde humana, veterinária e ambiental, monitorar o aparecimento de micro-organismos resistentes, acesso da população a antimicrobianos efetivos e medidas de controle de infecção na comunidade.

**Palavras-chave:** Fatores de virulência, Infecção hospitalar, Antimicrobianos.

##### **Abstract**

Bacteria of the genus *Staphylococcus* spp. they use several virulence factors to hinder the action of antimicrobial drugs, such as biofilm formation, toxins, enzymes, an efflux pump. Among these, biofilm constitutes an important bacterial survival factor, as it provides protection against antimicrobials, the immune system and environmental impasses. The formation and diversity of this structure favors the bacterial community. On the other hand, biofilm harms the treatment of antibiotic drugs leading to the worsening of infection both from the point of view of human and veterinary medicine.

In this context, One Health enables professions from different areas of knowledge to interact to strengthen surveillance of human, veterinary and environmental health, monitor the emergence of resistant microorganisms, population access to effective antimicrobials and infection control measures in the community.

**Keywords:** Virulence factors, Cross infection, Antimicrobials.

## **O Biofilme**

O Biofilme constitui um mecanismo de virulência importante para a sobrevivência bacteriana. Aproximadamente 80% das infecções são causadas por bactérias formadoras de biofilme. Várias doenças podem ser atribuídas a essa estrutura, como otites, vaginites, conjuntivites, uretrites, dentre outras (VERDEROSA, TOTSIKA e FAIRFULL-SMITH, 2019).

Nessa estrutura co-existem diversas células, clones, que conferem um padrão de resistência na colônia. Estes clones, apesar de serem geneticamente idênticos, são resistentes, provavelmente devido à expressão de substâncias, que prejudicam o mecanismo de ação dos antimicrobianos (LÓPEZ et al., 2010).

As condições de hipóxia e déficit nutricional resultam em uma baixa atividade metabólica e de divisão celular, além da barreira formada que dificulta a atuação dos antimicrobianos no interior dessa estrutura (ARCHER et al., 2011). Além do mais, existem hipóteses de que outros micro-organismos presentes na matriz polimérica, gerando uma comunidade heterogênea de bactérias, agravam o quadro infeccioso e o tratamento (RIBEIRO et al., 2016).

Na formação do biofilme os micro-organismos crescem aderidos a uma superfície, constituindo um complexo de células unidas por uma matriz extracelular. Essa matriz permite a nutrição da comunidade a partir da absorção de nutrientes, como carbono, nitrogênio, fosfato, além da proteção da colônia (ARCHER et al., 2011).

Em ambiente laboratorial, o processo de formação do biofilme se assemelha à fase estacionária de crescimento bacteriano, ou seja, a bactéria passa por mudanças metabólicas, tal como síntese de substâncias com propriedades antimicrobianas, pigmentos e moléculas de baixa massa molecular. Estes metabólitos podem ter como função a sinalização celular para iniciar a formação do biofilme (LÓPEZ et al., 2010).

## Mecanismos de Formação do Biofilme

Os mecanismos de formação do biofilme, bem como sua desestabilização podem ser gerados a partir de diversos fatores, incluindo ativação do sistema *quorum-sensing*, liberação de proteases, DNase, ácido cis-2-decenóico, D-aminoácidos (D-leucina, D-metionina, D-tirosina e D-triptofano) peptídeos solúveis em fenol, íons e mudanças de pH (RIBEIRO et al., 2016; PARK et al., 2012).

Inicialmente ocorre uma sobreposição de camadas de mucopolissacarídeos, ácido teicóico e proteínas do hospedeiro. O *Polysaccharide Intercellular Antigen* (PIA), é o principal componente do biofilme, sendo composto de resíduos de N-acetilglicosamina (80-85%). Este polissacarídeo é expresso na presença de algumas substâncias, como glicose, glucosamina, ácido oleico, concentrações sub-inibitórias de alguns antimicrobianos, ureia, anaerobiose, concentrações de Ferro ( $Fe^{+2}$ ), osmolaridade, altas temperaturas e o etanol (ARCIOLA et al., 2015).

A presença do PIA é, portanto, essencial para a manutenção das células na matriz polimérica. O cultivo em meio ágar vermelho congo, por exemplo, permite diferenciar bactérias PIA-positiva (colônias enegrecidas) e PIA-negativa. O processo de hemaglutinação também está envolvido na produção do PIA, sendo, por sua vez, uma análise qualitativa para verificar a produção deste polímero (BÜTTNER et al., 2015).

As etapas da formação do biofilme são: Ligação ou Adesão, Crescimento ou Maturação, e Disseminação ou Desestabilização. Na primeira a bactéria planctônica adere a uma superfície, em seguida ocorre à maturação de uma estrutura composta de células com diferentes padrões fenotípicos e genotípicos. Na segunda etapa ocorrem processos relacionados aos aspectos morfológicos, a motilidade, a expressão gênica e a sobrevivência das células, além da secreção de substâncias como o ácido teicóico, principalmente para bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. O último estágio do biofilme é o destacamento e dispersão das bactérias. Microcolônias também podem se destacar da matriz polimérica e chegar aos fluidos corporais, semelhante ao processo de metástase das células cancerígenas, infectando outras regiões do hospedeiro (BÜTTNER et al., 2015).



## **A diversidade de células no Biofilme**

As células que compõe o biofilme podem constituir subpopulações fenotipicamente distintas, a exemplo de outras bactérias e alguns fungos. Essa diversidade pode ser causada pela expressão de genes distintos. Tal fenômeno é dependente das condições extracelulares como, nutrientes, oxigênio, que criam um microambiente para o desenvolvimento das células (ARCHER et al., 2011; LÓPEZ et al., 2010).

Acredita-se que parte do biofilme é inativa metabolicamente (LÓPEZ et al., 2010). Esse estado fisiológico das células que compõe o biofilme pode ser monitorado pela análise da expressão de genes específicos a fim de definir as subpopulações que compõe o biofilme (ARCHER et al., 2011).

## **Resistência aos Antimicrobianos e Biofilme**

O crescente aumento de casos de micro-organismos multirresistentes e à contínua ênfase sobre os custos dos cuidados com a saúde tem chamado o interesse de muitos cientistas na busca por metodologias, bem como para desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos que superem as resistências e sejam eficazes em termos de custos hospitalares (SOO-HWAN, 2011).

As infecções bacterianas elevam os custos hospitalares. Isso é reflexo não só do tratamento errado, como também do período de internação. Diante disso, as infecções causadas por micro-organismos multirresistentes estão entre os gastos mais elevados, devido ao caráter multidimensional, muitas vezes associado à utilização de antimicrobianos de última geração, como Penicilinas, Aminoglicosídeos e Cefalosporinas (LEONCIO et al., 2019).

O aparecimento de resistência à penicilina, oxacilina, clindamicina e vancomicina, por serem os principais antimicrobianos utilizados na prática clínica contra infecções causadas por *Staphylococcus* sp. gera um grande desafio na saúde. Daí a importância de testes adicionais para o diagnóstico laboratorial da resistência, a fim de permitir uma terapêutica mais efetiva (MIMICA, 2012).

Logo, diversas ações estão sendo direcionadas para prevenir, desestabilizar a matriz polimérica, enfraquecer o sistema de comunicação bacteriana (*quorum-sensing*) ou mesmo matar a comunidade microbiana formadora do biofilme. Os compostos de

origem natural ou sintética estão ganhando destaque no controle da patogenicidade. Estes compostos podem ter ação tanto antibiótica como imunomodulatória, além da ação sobre a expressão de genes envolvidos na formação do biofilme (RIBEIRO et al., 2016).

Portanto devido à resistência aos antimicrobianos, faz-se necessário novos estudos com intuito de desenvolver métodos alternativos para o tratamento de doenças bacterianas, e toxicidade causada com o tratamento, por via oral, na maioria das vezes (HANKE et al., 2013; ŽALNĚRAVIČIUS et al., 2018). Para a erradicação do biofilme por protocolos convencionais se torna, muitas vezes impossível. A administrações de antimicrobianos pode levar a casos de toxicidade e efeitos colaterais, além de limitações na função renal e hepática. Combinação de antimicrobianos com diferentes mecanismos pode constituir uma solução favorável para o tratamento de infecções por biofilmes (TANG et al., 2012; TANG et al., 2013).

### **Saúde Única (*One Health*) e Resistência bacteriana**

A saúde humana, animal e ambiental estão sempre trabalhando juntas. O crescimento das relações existentes entre estas populações define os parâmetros da Saúde Única (*One Health*). Esta trata de conceitos conjuntos para promover a saúde e o bem-estar de todas as espécies. Isso só é possível graças à combinação de diferentes áreas multidisciplinares, os estudos ambientais, dentre outras (MILLER, 2010).

Os microbiologistas estão centrados no isolamento e análise da evolução de micro-organismos patogênicos, além de alertar para o impacto epidemiológico em relação à disseminação na comunidade. Portanto a *One Health* busca estratégias para intervir com a disseminação de doenças emergente e reemergentes evitando, assim, surtos na população em geral (LAMMIE e HUGHES, 2016).

Neste contexto estão inseridas também as doenças de origem alimentar, que são fonte para crescimento de diversos micro-organismos. Com a industrialização houve, além do progresso, o aparecimento de diversos problemas, a exemplo da transmissão de doenças por meio do consumo do leite. Esse carrega diversos patógenos que levam a surtos endêmicos na população. As infecções por bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre as mais comuns devido, principalmente, a produção de toxinas resistentes ao processo de pasteurização (DHANASHEKAR et al., 2012).

Diante disso, a resistência antimicrobiana é um problema complexo e multifatorial de caráter urgente para a saúde global. Isso é resultado do aparecimento de “super-bactérias” resistente à múltiplas drogas. A utilização de antimicrobianos de forma empírica promove a seleção de patógenos, bem como altera a microbiota normal de humanos, animais, além da contaminação ambiental. Isso favorece o aparecimento de isolados resistentes (MILLER, 2010).

A *One Health*, desta forma, possibilita que profissões de diversas áreas de conhecimento interajam para fortalecer a vigilância à saúde humana e animal, monitorar o aparecimento de micro-organismos resistentes, desenvolver novos agentes antimicrobianos, buscar novas alternativas terapêuticas, desenvolver testes rápidos de diagnóstico, vacinas, e elaborar programas educacionais para comunidade em geral (LAMMIE e HUGHES, 2016).

Além do mais, existem algumas barreiras que dificultam o acesso à antimicrobianos eficazes, como a dificuldade de entrada no mercado, administração falha na seleção de fármacos, políticas governamentais, sistemas de saúde fracos, cadeias de suprimentos não confiáveis e problemas no controle de qualidade. Esses fatores contribuem para aumento dos casos de morte por infecções bacterianas “tratáveis”, além do fator de resistência. Dessa forma, o acesso a antimicrobianos é essencial para reduzir o aparecimento de infecções. Todavia, o uso tem o potencial de selecionar resistência e deve ser cuidadosamente gerenciado para garantir sua eficácia em longo prazo (FROST et al. 2019).

Os antimicrobianos, então, são agentes importantes do ponto de vista da medicina humana, veterinária e ambiental. Todavia sua eficácia está cada vez mais prejudicada devido à seleção de micro-organismos resistentes. Recentes descobertas mostram que é possível reverter a seleção de isolados resistentes e, conseqüentemente, a evolução da resistência aos antimicrobianos. Isso é possível a partir da combinação de drogas antimicrobianas com diferentes perfis de ação farmacológica. Mutações que conferem resistência a um determinado antimicrobiano, por exemplo, podem ser neutralizadas se houver uma ação sinérgica entre os compostos (BAYM; STONE e KISHONY 2016).

O conhecimento sobre como os micro-organismos resistentes à determinada terapia antimicrobiana influencia na susceptibilidade a outras drogas está se tornando,

cada vez mais, importante no contexto da saúde global (PÁL; PAPP e LÁZÁR 2015). Atualmente, com os avanços tecnológicos, como automação laboratorial e sequenciamento do genoma, aumentou o interesse por um fenômeno conhecido como Sensibilidade colateral. Nesse fenômeno um micro-organismo resistente a um antimicrobiano pode, concomitantemente, apresentar uma diminuição ou aumento da sensibilidade a um segundo composto (MUNK et al., 2014).

Desta forma, patógenos multirresistentes, como *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (MRSA), estão cada vez mais comuns em casos de doenças infecciosas. Isso pode ser efeito da regressão à era “pré-antimicrobiano”. A utilização da combinação de drogas tem se tornado um tratamento bem sucedido para este tipo de infecção, pois permite a ação em múltiplos alvos farmacológicos, o aumento da eficácia do antimicrobiano e a supressão da evolução da resistência devido ao fenômeno da sensibilidade colateral (GONZALES et al., 2015).

Em relação às bactérias do gênero *Staphylococcus* pode-se dizer que são consideradas um desafio no contexto da saúde humana e animal em virtude do aparecimento de isolados resistentes à terapia antimicrobiana usual. Daí a importância de testes adicionais para o diagnóstico laboratorial da resistência, a fim de permitir uma terapêutica mais efetiva (AKINDOLIRE et al., 2015; MIMICA 2012).

## **Conclusão**

Assim, observa-se que o biofilme constitui um mecanismo de resistência antimicrobiana de suma importância quando transcendemos para o contexto da *One Health*. Medidas devem ser tomadas para reduzir casos que contribuam para seleção de isolados multirresistentes. Dentre essas medidas, podemos citar o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana, aperfeiçoamento nos métodos de detecção de resistência em hospitais, implementação de medidas de controle de infecção hospitalar e promoção do uso racional de medicamentos são formas para controlar a disseminação de micro-organismos na comunidade.

## Referências Bibliográficas

- AGNIHOTRI, S. A.; SOPPIMATH, K. S.; BETAGERI, G. V. Controlled release application of multilamellar vesicles: a novel drug delivery approach. **Drug Deliv**, v. 17, n. 2, p. 92-101, 2010.
- AKINDOLIRE, M. A. et al. Detection of Antibiotic Resistant *Staphylococcus aureus* from Milk: A Public Health Implication. **Int. J. Environ. Res. Public Health.**, v. 12, p. 10254-10275, 2015.
- ALTIERI, K. T. et al. Eradication of a Mature Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilm From Acrylic Surfaces. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 5, p. 487-491, 2013.
- ARCHER, N. K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.
- ARCIOLA, C. R. et al. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 1-7, 2015.
- ATIQUÉ, T. S. C. et al. Sensibilidade à meticilina/oxacilina de *Staphylococcus aureus* isolados da mucosa nasal de alunos do Centro Universitário de Rio Preto. **Rev. Bras. Farm.** v. 93, n. 3, p. 347-352, 2012.
- BARREIRO, E. J. e Bolzani V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova.** v. 32, n. 3, p.679-688, 2009.
- BAYM, M.; Stone L. K. e Kishony R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science.**, v. 351, p. 3292-1-8, 2016.
- BÜTTNER, H. et al. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p.1-15, 2015.
- CAMPERIO, C. et al. Mouse mastitis model to study the effects of the intramammary infusion of a food-grade *Lactococcus lactis* strain. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184218>, **Plos one**, 2017.

- COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290–302, 2006.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.** v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.
- CRAGG, G. M. e Newman D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1830, p. 3670–3695, 2013.
- DHANASHEKAR, R. et al. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. **GERMS.**, v. 2, n. 3, p. 101-109, 2012.
- FROST, I. et al. Access Barriers to Antibiotics. Washington, DC: **Center for Disease dynamics, Economics & Policy**, 2019.
- GOMES, F.; SAAVEDRA, M. J.; HENRIQUES, M. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. **Pathog Dis.**, v. 74, n. 3, 2016.
- GONZALES, P. R. Synergistic, collaterally sensitive  $\beta$ -lactam combinations suppress resistance in MRSA. **Nature Chemical Biology.**, v. 11, p. 855-865, 2015.
- HANKE, M. L. et al. Targeting Macrophage Activation for the Prevention and Treatment of *Staphylococcus aureus* Biofilm Infections. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 5, p. 2159–2168, 2013.
- KAMUGAI, Y. The chemical biology of naphtho-quinones and its environmental implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v. 52, p. 221–247, 2012.
- LAMMINE, S. L. e Hughes J. M. Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.**, v. 7, p. 287–312, 2016.
- LEONCIO, J. M. Impacto das infecções relacionadas à assistência à saúde nos custos da hospitalização de crianças\*. **Rev Esc Enferm USP**, v. 53, p. 03486, 2019.

- LETCHFORD, K.; Burt, H. "A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes". **Eur J Pharm Biopharm**, v. 65, n. 3, p. 259-69, 2007.
- LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluation dose-effect experiments. **J. of Pharmac. Exp. Ther.**, v. 96, p. 99-113, 1949.
- LÓPEZ, D; Vlamakis, H; Kolter, R. Biofilms. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v. 2, n. 7, p. 1-11, 2010.
- MILLER, J. M. Implications of the One Health Paradigm for Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 32, p. 51-57, 2010.
- MIMICA, M. J. Atualização sobre detecção laboratorial de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med**. v. 57, p. 129-34, 2012.
- MUNCK, C et al. Prediction of resistance development against drug combinations by collateral responses to component drugs. **Sci Transl Med.**, v. 12, n. 6, p. 156-262, 2014.
- NIKAM, V. K. et al. Eudragit a Versatile Polymer: a Review. *Pharmacologyonline.*, v.1, p.152-164, 2011.
- PAHARIK, A. E. e Horswill A. R. Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. **Microbiol Spectr.** v. 4, n.2, p. 529-566, 2016.
- PÁL, C. Papp B. Lázár, V. Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. *Trends in Microbiology.*, Dói: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.009>, p. 1-7, 2015.
- PARK, J-H et al. Extracellular protease in Actinomycetes culture supernatants inhibits and detaches *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Biotechnol Lett**, v. 34, p. 655–661, 2012.
- RIBEIRO, S. M. et al. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 160, p. 133–144, 2016.

- SONJE, A. e Chandra A. Comprehensive Review on Eudragit polymers. **Res. J. Pharm.**, v. 4, n. 5, p. 71-75, 2013.
- STEFANOVIC, O. D.; Stanojevic, D. D; Omiđc, L. R. Synergistic antibacterial activity of salvia officinalis and cichorium intybus extracts and antibiotics. **Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research**, v. 69, n. 3, p. 457-463, 2012.
- TANG, H. J. et al. In Vitro efficacies and resistance profiles of rifampin-based combination regimens for biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5717–5720, 2013.
- TANG, H. J. et al. In vitro efficacy of fosfomicin-containing regimens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 944–950, 2012.
- TAYLOR, P. W. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial. **International Journal of Antibacterial Agents**. v. 42, p. 195-201, 2013.
- UPADHYAY, A. et al. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. **BioMed Research International**, Dóí: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/761741>, p. 1-18, 2014.
- VERDEROSA, A. D., TOTSIKA M. e FAIRFULL-SMITH, K. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. **Front. Chem.**, v. 7, p. 1-17, 2019.
- ŽALNĚRAVIČIUS, R. et al. Fe(II)-substituted cobalt ferrite nanoparticles against multidrug resistant microorganisms. **Applied Surface Science**, v. 435, p. 141–148, 2018.



## 5. CAPÍTULO 2 - O uso da metodologia do *Checkerboard* para selecionar compostos antimicrobianos

**Antonio Wilton Cavalcante Fernandes<sup>1</sup>; Naiana Braga Freire<sup>1</sup>; Gerefeson de Araújo Silva<sup>1</sup>; Edilson do Carmo Marins Júnior<sup>2</sup>; Andrea Vieira Colombo<sup>3</sup>; Mateus Matiuzzi da Costa<sup>4</sup>**

*1 - Mestre do Programa de Recursos Naturais do Semiárido – PgRNSA da Universidade Federal do Vale do São Francisco.*

*2 – Acadêmico de biologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.*

*3 - Professora Assistente do colegiado de Farmácia da Universidade Federal do Vale do São Francisco*

*4 - Professor Associado do colegiado de Zootecnia da Universidade Federal do Vale do São Francisco.*

### **Resumo:**

A combinação sinérgica entre o produtos naturais e o antimicrobiano é uma alternativa para o controle e erradicação de bactérias multirresistentes. Como vantagem há aumento do espectro de ação do antimicrobiano, a redução da toxicidade, o uso de baixas doses da droga, a prevenção da seleção de bactérias resistentes durante a terapia e o fenômeno da Sensibilidade colateral. Isso é possível por meio da Metodologia do *Checkerboard*. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão sistemática sobre estudos em que utilizaram a metodologia do *Checkerboard* para avaliar o sinergismo entre produtos naturais e antimicrobianos frente às bactérias patogênicas. Foi realizada uma busca de trabalhos, adotando dois conjuntos de intersecção: sinergismo pelo método *Checkerboard* e antimicrobianos em combinação com extratos de produtos naturais. Com o objetivo de proporcionar uma padronização do procedimento metodológico. A busca eletrônica inicial resultou em 96 manuscritos. O processo de análise dos estudos envolveu leitura de títulos, resumos e textos completos. Após todas essas fases, 21 artigos preencheram os critérios de inclusão da revisão. No delineamento, 15 (71,4%) estudos conseguiram um efeito sinérgico entre os compostos testados. Além disso, a padronização da metodologia se faz necessário, bem como os valores de IFI (Índice da Fração Inibitória) no intuito de reduzir a variabilidade e reprodutibilidade.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano, Produto natural, Sinergismo, Resistência.

## **Abstract**

The synergistic combination of natural and antimicrobial products is an alternative for the control and eradication of multi-resistant bacteria. As an advantage, there is an increase in the spectrum of action of the antimicrobial, a reduction in toxicity, the use of low doses of the drug, the prevention of the selection of resistant bacteria during therapy and the phenomenon of collateral sensitivity. This is possible through the *Checkerboard* Methodology. Therefore, the objective of this work was to make a systematic review of studies in which they used the *Checkerboard* methodology to assess the synergism between natural and antimicrobial products against pathogenic bacteria. A search for works was carried out, adopting two sets of intersection: synergism by the *Checkerboard* method and antimicrobials in combination with extracts of natural products. In order to provide a standardization of the methodological procedure. The initial electronic search resulted in 96 manuscripts. The study analysis process involved reading titles, abstracts and full texts. After all these phases, 21 articles met the inclusion criteria for the review. In the design, 15 (71.4%) studies achieved a synergistic effect between the compounds tested. In addition, standardization of the methodology is necessary, as well as the values of IFI (Inhibitory Fraction Index) in order to reduce variability and reproducibility.

**Keywords:** Antimicrobial, Natural product, Synergism, Resistance.

## **1. Contexto das infecções e terapias antimicrobianas**

As infecções são consideradas como uma das principais causas de doença ao longo da história da humanidade, mas com a descoberta e a introdução dos antimicrobianos, este problema tendeu a desaparecer (BAPTISTA, 2013). Apesar de existirem muitas terapias antimicrobianas disponíveis, o uso indiscriminado de compostos antimicrobianos selecionou muitas bactérias patogênicas multirresistentes, sendo o controle de sua disseminação um importante desafio (KYRIACOU; BROWNLOW; XU, 2004; KIM et al., 2007; COELHO et al., 2007).

Devido ao aumento no número de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos e à contínua ênfase sobre os custos dos cuidados com a saúde, muitos cientistas têm pesquisado metodologias para desenvolver novos agentes antimicrobianos que superem a resistência bacteriana e sejam eficazes em termos de custos (SOO-HWAN, 2011).

Atualmente, a utilização de compostos de origem natural ou sintética tem sido alternativas para o controle da patogenicidade causada por isolados de micro-organismos produtores de biofilme em diferentes situações clínicas. Estes compostos podem ter ação tanto antibiótica como imunomodulatória, além da ação sobre a expressão de genes envolvidos na formação do biofilme, mecanismo este responsável por diversos processos de resistência as terapias convencionais (COS et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016). Aliado a isto, a busca de novos agentes antimicrobianos utilizando fitoterápicos é bastante intensa, principalmente devido aos custos de pesquisa e por apresentarem menor risco de efeitos colaterais (SALEEM et al., 2010).

Existem muitos estudos que indicam que os usos de extratos de plantas bioativas ou de compostos puros isolados aumentam a eficácia *in vitro* de antimicrobianos utilizados contra uma variedade de micro-organismos, agindo sinergicamente (STEFANOVIC; STANOJEVIC; OMIC, 2012).

As vantagens desta combinação são o aumento do espectro de ação do antimicrobiano, a redução da toxicidade deste, o uso de baixas doses da droga, a prevenção da seleção de bactérias resistentes durante a terapia e o aparecimento do fenômeno de sensibilidade colateral (RIBEIRO et al., 2016). Dada a prevalência de mutações que conferem resistência com efeitos pleiotrópicos, a multirresistência pode produzir hipersensibilidade a outras classes de antimicrobianos (NICHOL et al., 2019).

A sensibilidade colateral é resultado de alterações metabólicas em virtude da presença de substância antimicrobiana. Na análise do sinergismo, este fenômeno aparece como uma consequência da ação conjunta de duas drogas com ação antimicrobiana, uma vez que o ensaio pode ser feito com um antimicrobiano padrão, no qual a isolado de micro-organismo em estudo é resistente, e uma substância de origem natural ou sintética, fazendo com que a bactéria comece a apresentar sensibilidade. Isso possibilita uma ferramenta extra no controle e erradicação de bactérias multirresistentes. Esta abordagem no desenvolvimento de novos fármacos está cada vez mais presente nos estudos em virtude do aparecimento de antimicrobianos e da velocidade com que os micro-organismos patogênicos resistentes emergem, havendo a necessidade de buscar novas estratégias para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (MUNK et al., 2014; PÁL; PAPP e LÁZÁR 2015).

Diante disso, o sinergismo de dois ou mais antimicrobianos podem ser avaliado por várias metodologias, porém o método de microdiluição *Checkerboard* (da tradução, tabuleiro de xadrez) tem sido um dos mais tradicionais para avaliação sinérgica (RAND et al., 1993). Esta metodologia é a mais utilizada para avaliar combinações de

antimicrobianos, devido a fácil interpretação, cálculos simples e materiais de fácil acesso em um laboratório de microbiologia (MACEDO et al., 2013).

## **2. Revisão sistemática**

Neste trabalho foram pesquisados artigos e periódicos originais que relacionavam o efeito sinérgico de produtos naturais com antimicrobianos frente às bactérias patogênicas, utilizando a metodologia do checkerboard. A pesquisa foi realizada nas bases de dados eletrônicas *ScienceDirect* e *PubMed*, utilizando as palavras ou expressões chave: Sinergismo pelo método checkerboard e antimicrobianos em combinação com extratos de produtos naturais. Na avaliação dos artigos foram analisados os seguintes critérios: a descrição da metodologia e o efeito da combinação do antimicrobiano com o produto natural. Trabalhos que não se enquadravam nestes critérios (palavras-chave ou expressões relacionadas ao tema) foram rejeitados ou excluídos da pesquisa.

### **2.1 Resultados**

Foram identificadas 96 publicações relacionadas ao tema proposto. Essas foram selecionadas no ano de 2017, sendo o critério de escolha, trabalhos publicados de 2006 até 2016. Os trabalhos foram avaliados e 21 se enquadravam nos critérios descritos anteriormente. Desses 15 (71,4% aproximadamente) artigos conseguiram um efeito sinérgico entre os compostos testados (Quadro 1).

**Quadro 1.** Análise dos artigos encontrados, em ordem cronológica, que se enquadravam nos critérios de descrição da metodologia e o efeito da combinação do antimicrobiano com o produto natural.

<b>Substância isolada</b>	<b>Antimicrobiano (s)</b>	<b>Micro-organismos</b>	<b>Efeito encontrado</b>	<b>Referência</b>
Óleo essencial de <i>Pelargonium graveolens</i>	Norfloxacina	<i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Aditivo Sinérgico Sinérgico Aditivo	ROSATO et al., 2007*
Extrato etanólico de <i>Hyptis martiusii</i>	Gentamicina Canamicina Amicacina Neomicina	<i>S. aureus</i> MRSA	Aditivo Aditivo Indiferente Indiferente	COUTINHO et al., 2010*
Galangina, quercetina e baicaleína extraído de <i>Alpinia officinarum</i>	Ceftazidima	<i>S. aureus</i>	Sinérgico	EUMKEB; SAKDARAT; SIRIWONG, 2010*

Extrato metanólico de <i>Punica granatum</i>	Ciprofloxacina	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Indiferente para todas as isolado s	DEY et al., 2012
Extrato aquoso de <i>Psidium guineense</i>	Ampicilina Amoxicilina Cefoxitina Ciprofloxacina Meropenem	<i>S. aureus</i> MRSA	Sinérgicos	FERNANDES et al., 2012
Extrato etanólico de <i>Eucalyptus torelliana</i>	Claritromicina	<i>Helicobacter pylori</i>	Aditivo	LAWAL et al., 2012
Fração Acetato de etila de <i>Lygodium venustum</i>	Gentamicina Amicacina Neomicina	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Sinérgico apenas para o extrato combinado com Amicacina.	MORAIS-BRAGA et al., 2012*

Extrato aquoso de <i>Cocos nucifera</i> var. <i>typica</i>	Meticilina Vancomicina	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Sinérgico na combinação com metecilina e Indiferente para vancomicina dos dois isolados	SILVA et al., 2013
$\beta$ -Lapachona de <i>Tabebuia avellanedae</i>	Ampicilina Amoxicilina Cefoxitina Ciprofloxacina Meropeném	<i>S. aureus</i>	Sinérgico Sinérgico Indiferente Sinérgico Sinérgico	MACEDO et al., 2013
Galotanino 1,2,6-tri-O-galloil-b-D-glucopiranosose de <i>Terminalia chebula</i>	Trimetoprim Gentamicina Amoxicilina, Ceftazidima Ciprofloxacina	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	Sinérgico Sinérgico Aditivo Aditivo Aditivo	BAG; BHATTACHARYYA; CHATTOPADHYAY, 2013
Cafeína, Reserpina, Pirrolidina, Teofilina e Quinina	Ampicilina Ciprofloxacina Eritromicina Tetraciclina	<i>S. aureus</i> MRSA	Indiferente Aditivo Indiferente Sinérgico	ABREU et al., 2014*

Óleo essencial de <i>Myrtus communis</i>	Ciprofloxacina	<i>A. baumannii</i>	Sinérgico	ALEKSIC et al., 2014*
Extrato etanólico (95%) de <i>Stephania suberosa</i>	Ampicilina	<i>S. aureus</i>	Sinérgico	TEETHAISONG et al., 2014
Óleo essencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> var. ( <i>ambrosioides</i> ).	Cefixima Ciprofloxacina canamicina	<i>Bacillus cereus</i> <i>Micrococcus luteus</i>	Sinergismo para todas as combinações.	BRAHIM et al., 2015*
Flavonóides e Taninos ( <i>Duabanga grandiflora</i> )	Ampicilina	<i>S. aureus</i> MRSA	Sinérgico	SANTIAGO et al., 2015



Extrato etanólico de <i>Berberis aristata</i>	Colistina Tigeciclina Meropeném Ertapeném Amoxicilina	<i>E. coli</i>	Sinérgico Antagônico Antagônico Sinérgico	THAKUR et al., 2016*
Óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i>	Cefoperazona Piperacilina Ciprofloxacina Tetraciclina Cloramfenicol Gentamicina	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Indiferente Indiferente Sinérgico Sinérgico Sinérgico Sinérgico	LUIZ et al., 2016
Óleo essencial de <i>Eucalyptus radiata</i>	Cefoperazona Piperacilina Ciprofloxacina Tetraciclina Cloramfenicol Gentamicina	<i>A. baumannii</i>	Aditivo Indiferente Sinérgico Sinérgico Sinérgico Sinérgico	
Óleo essencial de <i>Thymus</i>	Ampicillina Amoxicillina Tetraciclina	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Antagônicos	ADRAR; OUKIL; BEDJOU, 2016

<i>numidicus</i> e <i>Salvia officinalis</i>	Cloramfenicol Cefotaxima Ciprofloxacina			
---	---	--	--	--

(\*) Não descreveram como a técnica foi realizada.

Estes resultados evidenciam o potencial destas combinações de produtos naturais e antimicrobianos (BOLLENBACH, 2015). Observa-se que muitos trabalhos envolvem a análise de efeito sinérgico para melhorar o tratamento de infecções causadas por bactérias. Todavia, apesar da ação antibacteriana de alguns compostos de origem natural, o fenômeno da resistência ainda é um problema quando se avaliam casos de infecções por micro-organismos (ARCHER et al., 2011; LÓPEZ, VLAMAKIS e KLOTTER, 2010).

Nesses trabalhos os autores avaliaram os efeitos da combinação de um produto de origem natural com um antimicrobiano padrão. Como consequências puderem observar: uma redução na concentração do antimicrobiano e, com isso, dificuldade de seleção de isolados clínicos resistentes aos antimicrobianos utilizados na prática clínica e redução da toxicidade do antimicrobiano. Todavia o grande impasse para o desenvolvimento de drogas combinadas é o pouco conhecimento do mecanismo de ação das substâncias de origem natural (MU et al., 2013; REUK-NGAM et al., 2014).

### **3. Análise da metodologia do *Checkerboard***

O termo *Checkerboard* se refere ao padrão de diluição de determinado antimicrobiano distribuído em uma microplaca de 96 poços nova e estéril para realização das microdiluições. Inicialmente, para realização desta técnica é necessário ter o valor referente da CIM (Concentração Inibitória Mínima) das substâncias que serão testadas nas combinações, que é determinada seguindo as descrições do protocolo M07-A9 (CLSI, 2014), o qual consiste inicialmente em sucessivas microdiluições em caldo.

Para avaliação a combinação dos agentes antimicrobianos testados é utilizada múltiplas combinações em concentrações referentes ao valor da CIM em diferentes diluições, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 para cada micro-organismo que está sendo testado (LORIAN, 1980). No eixo X (horizontal em relação à microplaca) são distribuídas diferentes concentrações e volume crescentes de um agente antimicrobiano, da esquerda para direita, de forma crescente, enquanto que no eixo Y (vertical) será distribuído o outro agente antimicrobiano (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

Uma vantagem deste método é a possibilidade de analisar combinações de diferentes concentrações para uma mesma amostra, além de utilizar pequenos volumes. Todavia a limitação é que esta metodologia só determina a atividade inibitória (LORIAN, 1980).

O critério de distribuição dos antimicrobianos nas placas é comum a todos os estudos que utilizam esta técnica, porém existe uma variação nas quantidades de meios de cultura, antimicrobianos e bactérias que são colocados em cada poço. Nesta revisão, observou-se esta variação em muitos autores dos manuscritos (Quadro 1) não descreveram na íntegra o método, apenas citaram a referência ou descreveram superficialmente, ocultando estes dados importantes. Isto dificulta, muitas vezes, a reprodutibilidade do estudo e um resultado satisfatório e confiável.

Considerando o emprego variado dos protocolos usados na técnica do Checkerboard a padronização se torna necessária. Diante disso, uma metodologia de acordo com os artigos escolhidos para elaboração da uniformização proposta. A metodologia do Checkerboard, de forma geral, pode ser descrita com base no procedimento a seguir:

### **1. Preparação da suspensão microbiana**

Inicialmente, a suspensão bacteriana deverá ser padronizada a partir de uma cultura com 24 horas de incubação em meio MH (*Mueller-Hinton*), com adição de PBS pH 7.0 estéril até atingir a turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL).

### **2. Distribuição dos produtos na microplaca (Figura 1)**

2.1 Adicionar 100  $\mu$ L de caldo MH em todos os poços.

2.2 Na coluna nº6 adicionar 100  $\mu$ L do antimicrobiano A, na concentração de 4X o valor da CIM, para realização da diluição seriada, transferindo sequencialmente 100 $\mu$ L do volume do poço, no sentido horizontal, até a coluna um (1), obtendo-se no final seis diluições referentes a 1x, 1/2x, 1/4x, 1/8x, 1/16x e 1/32x do valor da CIM.

2.3 Na linha “A” adicionar 100  $\mu$ L da solução correspondente ao produto natural (Antimicrobiano B), na concentração de 2X o valor da CIM, e diluir seriadamente, transferindo sequencialmente 100  $\mu$ L do volume do poço, no sentido vertical até a linha F, obtendo-se no final seis diluições referentes a 1x, 1/2x, 1/4x, 1/8x, 1/16x e 1/32x do valor da CIM (Figura 1).

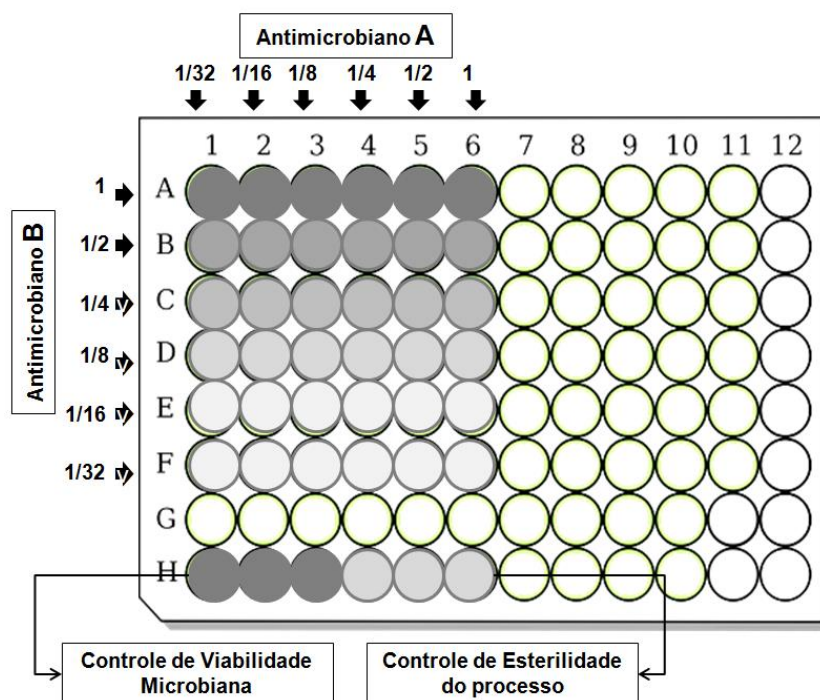
2.4 Ao final do processo de diluição seriada, cada poço da microplaca irá conter um volume de 100  $\mu$ L. Diante disso, acrescentar em cada poço, no máximo, 10% do volume (ex.,  $\leq 10$   $\mu$ L de inóculo em 0,1 mL de solução de agente antimicrobiano) (NCCLS, 2003).

### 3. Controles

3.1 Nos poços H1, H2 e H3 serão adicionados apenas os 10  $\mu$ L da suspensão bacteriana, juntamente com 100  $\mu$ L de meio MH, a fim de verificar a viabilidade da bactéria submetida as condições experimentais.

3.2 Nos poços H4, H5 e H6 serão adicionados apenas 100  $\mu$ L do meio MH, servindo como controle de esterilidade do processo.

4. As microplacas serão incubadas a 37 °C por 24 horas.



**Figura 1. Desenho esquemático da metodologia do Checkerboard** (Fonte: Autor).

### 5. Determinação do efeito sinérgico

5.1 Após incubação, uma alíquota da solução de Resazurina (100  $\mu$ g/mL) ou solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) será acrescida em cada poço e a microplaca será novamente incubada por aproximadamente 1 hora.

5.2 Decorrido este tempo anotar os valores onde não houve mudança de coloração, vermelho ou violeta, indicativo da atividade oxidativa da bactéria e, conseqüentemente, sua viabilidade. Esses valores são correspondentes a concentração de substâncias em combinação. De posse destes resultados calcular o Índice de Fração Inibitória (IFI).

As interações são calculadas a partir de uma equação e então definidas como sinérgica, indiferente ou antagonista e comparada com os valores de CIM da substância teste e do antimicrobiano isoladamente. Para determinar a interação entre duas ou mais substâncias, algumas considerações devem ser analisadas: a curva padrão dose-resposta (Isoblograma) de cada droga sozinha com diferentes concentrações e a análise de combinação entre as drogas pode ser feita pelo *checkerboard*, no qual é feita uma análise da equação dose-resposta individual e combinada (CHAU e TALALAY, 1984 MARTINEZ-LRUJO et al., 1996)

A interpretação do efeito sinérgico de cada antimicrobiano e das combinações são determinadas e utilizadas para o cálculo do índice da fração inibitória (IFI), por meio da seguinte **fórmula**:

$$\text{IFI do produto natural (PN)} = \frac{\text{CIM combinado}}{\text{CIM do PN sozinho}}$$

$$\text{IFI do antimicrobiano (ATM)} = \frac{\text{CIM combinado}}{\text{CIM do ATM sozinho}}$$

$$\Sigma \text{IFI} = \text{IFI PN} + \text{IFI ATB}$$

Várias formas matemáticas têm sido propostas na busca para uma medição quantitativa de sinergia (MUNDY; PENDRY; RAHMAN, 2016). A maioria dos artigos utilizados nesta revisão utilizaram os seguintes critérios: sinergismo ( $\Sigma \text{IFI} \leq 0,5$ ), sinergismo parcial ( $0,5 < \Sigma \text{IFI} < 1$ ), aditivo ( $\Sigma \text{IFI} = 1$ ), indiferente ( $1 < \Sigma \text{IFI} < 4$ ) e antagonismo ( $\Sigma \text{IFI} \geq 4$ ). Outro parâmetro adotado classifcam um valor IFI de  $\leq 0,5$ , interpretado como sinergia,  $\text{IFI} > 0,5 - 4,0$ , como Indiferente e  $\text{IFI} > 4$  como antagonismo (DEY et al., 2012). Outros autores consideram sinergismo total ( $\text{IFI} \leq 0,5$ ), sinergismo parcial ( $0,5 < \text{IFI} \leq 0,75$ ), nenhum efeito ( $0,75 < \text{IFI} \leq 2$ ) ou antagonismo ( $\text{IFI} > 2$ ) (BRAHIM et al., 2015; MACEDO et al., 2013). Já no estudo desenvolvido por Eumkeb, Sakdarat e Siritwong (2010) foi proposto como efeito sinérgico apenas um  $\text{IFI} \leq 0,5$ , desconsiderando os outros critérios.

Devido às controvérsias apresentadas na literatura pesquisada, os valores de IFI deveriam ser padronizados no intuito de reduzir a variabilidade e garantir a reprodutibilidade dos resultados. Diante disso, para interpretação da metodologia do

*checkerboard* os critérios do IFI poderão ser assim analisados (LEE, JANG e CHA, 2012):

**Ação sinérgica ( $IFI \leq 0,5$ )**

**Aditiva ( $0,5 < IFI < 1$ )**

**Indiferente ( $1 < IFI < 2$ )**

**Antagônico ( $IFI \geq 2$ )**

Para fins de interpretação, a ação dos agentes antimicrobianos pode ser considerada **sinérgica** quando o seu efeito em combinação é maior que a soma dos efeitos produzidos pelos agentes separados; **aditivas**: quando o seu efeito é igual à soma dos efeitos dos agentes individuais; **indiferentes**, se o efeito conjunto é igual ao efeito de qualquer dos agentes individualmente e **antagonista** quando seu efeito combinado é menor do que a soma dos efeitos dos agentes individuais ou mais fraco do que o efeito de qualquer agente individual (SATISH; MOELLERING; ELIOPOULOS, 2005; SUCHER, 2014).

Apesar do método de *Checkerboard* ser o procedimento padrão para avaliar a interação dos compostos, que pode ser verificada por outros métodos. A princípio, esta revisão focou apenas no método *Checkerboard*, mas buscou observar se, além deste método, os autores dos artigos pesquisados buscaram comparar com outros métodos de avaliação de sinergismo. Alguns autores, além do método de *Checkerboard*, utilizaram o método de difusão em disco (DEY et al., 2012), o método episolométrico (E-test) (ABREU et al., 2014) e curva de morte (ALEKSIC et al., 2014; TEETHAISONG et al., 2014; SANTIAGO et al., 2015).

A avaliação através da curva de morte é demorada e trabalhosa, porém pode confirmar as determinações da CIM, bem como verificar o tempo exato de ação em que os antimicrobianos ocasionem a morte das bactérias analisadas (TEETHAISONG et al., 2014). Os dados do método de difusão em disco, apesar de ser simples, permitem apenas uma avaliação qualitativa e são bastante limitados para avaliar a sinergia, pois não fornecem dados precisos para comparar as atividades de diferentes compostos/extratos (MUNDY; PENDRY; RAHMAN, 2016). O método E-test representa a metodologia ideal para um laboratório de microbiologia clínica e de saúde pública de grande saída, uma vez que é um método simples e reprodutibilidade, permitindo testes com resultados mais rápidos para múltiplos isolados (LIU et al, 2014). No entanto, apresenta custos elevados quando comparado ao *checkerboard* e curva de morte (SOLTANI; KHALILI; SHAFIEE, 2012).

Diante disso, a uniformização ou padronização do método *Checkerboard* possibilita uma compreensão da metodologia e planejamento do experimento, uma vez que na literatura não a descrevem os detalhes. Isso é de extrema necessidade, visto que as terapias combinadas estão cada vez mais crescentes no intuito de diminuir o número de isolados resistentes à múltiplas drogas. Assim, combinações de fármacos, bem como interações com produtos naturais, reapresenta uma excelente alternativa para ser utilizado na terapia antimicrobiana.

### Referencial Bibliográfico

- ABREU, A. C. et al. Evaluation of the best method to assess antibiotic potentiation by phytochemicals against *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, p. 125–134, 2014.
- ADRAR, N.; OUKIL, N.; BEDJOU, F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in Combination. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 112–119, 2016.
- ALEKSIC, V. et al. Synergistic effect of *Myrtus communis* L. essential oils and conventional antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1666–1674, 2014.
- ARCHER N. K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms. **Virulence** v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.
- BAG, A.; BHATTACHARYYA, S. K.; Chattopadhyay, R. R. Isolation and identification of a gallotannin 1,2,6-tri-O-galloyl-b-D-glucopyranose from hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits effective against multidrug-resistant uropathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 390-397, 2013.
- BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos**. 2013. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.



- BOLLENBACH, T. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, p. 1–9, 2015.
- BRAHIM, M. A. S. et al. *Chenopodium ambrosioides* var. *ambrosioides* used in Moroccan traditional medicine can enhance the antimicrobial activity of conventional antibiotics. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 37–43, 2015.
- CHOU T. C e TALALAY P, Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Adv Enzyme Regal** v. 22, p. 27-55, 1984.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility**. Approved standard M27-A3, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2014.
- COELHO, S.M.O. et al. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 195 – 200, 2007.
- Cos P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 106, p. 290–302, 2006.
- COUTINHO et al. *In vitro* additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 9, p. 1002–1006, 2010.
- DEY, D. et al. Pomegranate pericarp extract enhances the antibacterial activity of ciprofloxacin against extended-spectrum b-lactamase (ESBL) and metallo-b-lactamase (MBL) producing Gram-negative bacilli. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 4302–4309, 2012.
- EUMKEB, G.; SAKDARAT, S.; SIRIWONG, S. Reversing  $\beta$ -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum*

- Hance and synergism with ceftazidime. **Phytomedicine**, v. 18, p. 40–45, 2010.
- FERNANDES, T. G. et al. In Vitro Synergistic Effect of *Psidium guineense* (Swartz) in Combination with Antimicrobial Agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-7, 2012.
- HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K. e DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine.**, v. 15, p. 639-652, 2008.
- KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, p. 95-101, 2007.
- KUMAR, A.S. et al. Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. **Bangladesh Journal Pharmacology**, v. 4, p. 13-6, 2009.
- KYRIACOU, S. V.; BROWNLOW, W. J.; XU, X. N. Using nanoparticle optics assay for direct observation of the function of antimicrobial agents in single live bacterial cells. **Biochemistry**, v. 43, p. 140-147, 2004.
- LAWAL, T. O. et al. Combination Studies of *Eucalyptus torelliana* F. Muell. Leaf Extracts and Clarithromycin on *Helicobacter pylori*. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 9, p. 1393-1398, 2012.
- LEE Y-S, JANG K-A e CHA J-D. Synergistic Antibacterial Effect between Silibinin and Antibiotics in Oral Bacteria. **J Biomed Biotechnol**. ID 618081, p. 1–7, 2012.
- LIU, H. et al.. Assessment of Etest as an Alternative to Agar Dilution for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1435–1440, 2014.
- LÓPEZ, D; VLAMAKIS, H; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v. 2, n. 7, p. 1-11, 2010.

- LUIZ, A. et al. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 274–282, 2016.
- MACEDO, L. et al. Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, v. 21, p. 25–29, 2013.
- MARTINEZ-LRUJO J. J. et al. A *Checkerboard* Method to Evaluate Interactions Between Drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 635-644, 1996.
- MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. Phenolic Compounds and Interaction between Aminoglycosides and Natural Products of *Lygodium venustum* SW against Multiresistant Bacteria. **Chemotherapy**, v. 58, p. 337–340, 2012.
- MU S. H. et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v. 20, p. 714-8, 2013.
- MUNK C. et al. Prediction of resistance development against drug combinations by collateral responses to component drugs. **Sci Transl Med.**, v. 6, n. 262, p. 1-29, 2014.
- MUNDY, L.; Pendry, B., Rahman, M. Antimicrobial resistance and synergy in herbal medicine. Review article. **Journal of Herbal Medicine**, v. 6, p. 53–58, 2016.
- NCCLS - National Committee Clinical and Laboratory Standards Institute. M7-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 9th ed. 2012.
- NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- NICHOL, D. et al. Antibiotic collateral sensitivity is contingent on the repeatability of evolution. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2019.

- PÁL C. PAPP B. LÁZÁR, V. Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. **Trends in Microbiology**., Dói: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.009>, p. 1-7, 2015.
- RAND, K. H. et al. Reproducibility of the Microdilution *Checkerboard* Method for Antibiotic Synergy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 3, p. 613-615, 1993.
- REUK-NGAM N. et al. Antimicrobial Activity of Coronarin D and Its Synergistic Potential with Antibiotics. **BioMed Research International**, v. 2014. Doi:| <https://doi.org/10.1155/2014/581985> , 2014.
- RIBEIRO S. M. et al. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 160, p. 133–144, 2016.
- ROSATO, A. et al. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine**, v. 14, p. 727–732, 2007.
- SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural product reports**, v. 27, n. 2, p. 238–254, 2010.
- SANTIAGO, C. et al. Inhibition of penicillin-binding protein 2<sup>a</sup> (PBP2a) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by combination of ampicillin and a bioactive fraction from *Duabanga grandiflora*. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 1-7, 2015.
- SATISH K.P.; Moellering R.C.; Eliopoulos G.M. Antimicrobial Combinations. In: **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Ed. Lorian V., p. 365, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005.
- SCHELZ, Z.; MOLNAR, J.; HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Fitoterapia**, v. 77, n. 4, p. 279-285, 2006.
- SILVA, R. R. et al. Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of *Cocos nucifera* var. *typica*. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-8, 2013.
- SOLTANI, R.; KHALILI, H.; SHAFIEE, F. Double-disk synergy test for detection of synergistic effect between antibiotics against nosocomial strains of

*Staphylococcus aureus*. *Journal of Research in Pharmacy Practice*, v. 1, n. 1, p. 21-24, 2012. doi:10.4103/2279-042X.99673.

SOO-HWAN, K. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Korean Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 77–85, 2011.

STEFANOVIC, O. D.; STANOJEVIC, D. D; OMIAC, L. R. Synergistic antibacterial activity of *salvia officinalis* and *cichorium intybus* extracts and antibiotics. **Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research**, v. 69, n. 3, p. 457-463, 2012.

SUCHER, N. J. Searching for synergy in silico, in vitro and in vivo. **Synergy**, v. 1, p. 30-43, 2014.

TEETHAISONG, Y, et al. Synergistic activity and mechanism of action of *Stephania suberosa* Forman extract and ampicillin combination against ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Science**, v. 21, p. 1 -11, 2014.

THAKUR, P. et al. Augmenting the potency of third-line antibiotics with *Berberis aristata*: In vitro synergistic activity against carbapenem-resistant *Escherichia coli*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 6, p. 10–16, 2016.

## 6. CAPÍTULO 3: $\beta$ -lapachona e Oxima do lapachol na interferência fenotípica de resistência por bomba de efluxo em *Staphylococcus aureus*

**Antonio Wilton Cavalcante Fernandes<sup>1\*</sup>; Edilson do Carmo Marins Júnior<sup>2</sup>;  
Márcio Rennan Santos Tavares<sup>3</sup>; Cleônia Roberta Melo Araújo<sup>4</sup>; Mateus MatiuZZi  
da Costa<sup>5</sup>.**

*1 – Mestre em Recursos Naturais do Semiárido - PgRNSA da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.*

*2 – Acadêmico de biologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.*

*3 – Professor do Instituto Federal do Sertão Pernambucano – Petrolina*

*4 – Professor Adjunto do colegiado de Farmácia da Universidade Federal do Vale do São Francisco.*

*5 - Professor Associado do Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.*

### **\*Autor correspondente:**

Antonio Wilton Cavalcante Fernandes

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina/PE, Brazil.

E-mail: [awcf23@gmail.com](mailto:awcf23@gmail.com)

### **Resumo**

As bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os principais patógenos nosocomiais. Esses apresentam diversos mecanismos de resistência, incluindo a presença de bombas de efluxo, que inviabilizam a chegada do antimicrobiano no sítio ativo, impossibilitando seu mecanismo de ação, reduzindo a efetividade e prognóstico ruim de infecções graves. O uso de inibidores de bomba de efluxo (IBE) ou combinação desses com compostos com fármaco que apresentam atividade antimicrobiana estão entre as alternativas para controle deste mecanismo de resistência. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação inibitória da  $\beta$ -lapachona e oxima do lapachol frente a bomba de efluxo em *S. aureus* multirresistente. A concentração inibitória mínima (CIM) e IBE por redução da CIM do brometo de etídio foram desenvolvidas. Além disso, a análise de *docking molecular* na proteína 1PW4 a fim de observar os possíveis sítios de interação e energias livres possibilitou uma compreensão dos sítios de interação com as moléculas-

alvo. Apesar da ausência de atividade inibitória de bomba para os derivados do lapachol, foi constatado que a oxima do lapachol apresentou interferência com o mecanismo de bomba de efluxo, incluindo sítios de interação comum com o Carbonil Cianeto m-Clorofenilhidrazona (CCCP), um inibidor de bomba. Dessa forma, verifica-se que algumas moléculas naturais podem restaurar a atividade antimicrobiana e estimular a pesquisa de novos IBE, reduzindo, assim, a pressão seletiva de resistência bacteriana.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano, Produto Natural, Inibição de bomba, Resistência.

### **Abstract**

*Staphylococcus* are among the main nosocomial pathogens. These have several resistance mechanisms, including the presence of efflux pumps, which prevent the arrival of the antimicrobial at the active site, making its mechanism of action impossible, reducing the effectiveness and poor prognosis of serious infections. The use of efflux pump inhibitors (IBE) or combination of these with compounds with drugs that have antimicrobial activity are among the alternatives to control this resistance mechanism. Therefore, the objective of the study was to evaluate the inhibitory action of  $\beta$ -lapachone and lapachol oxime against the efflux pump in multiresistant *S. aureus*. The minimum inhibitory concentration (MIC) and IBE by reducing the MIC of ethidium bromide were develop. In addition, the analysis of molecular docking in the 1PW4 protein in order to observe the possible interaction sites and free energies enabled an understanding of the interaction sites with the target molecules. Despite the absence of pump inhibitory activity for lapachol derivatives, lapachol oxime was found to interfere with the efflux pump mechanism, including sites of common interaction with Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone (CCCP), an inhibitor of bomb. Thus, it appears that some natural molecules can restore antimicrobial activity and stimulate the search for new IBE, thus reducing the selective pressure of bacterial resistance.

**Keywords:** Antimicrobial, Natural Product, Pump inhibition, Resistance.

### **1- Introdução**

*Staphylococcus aureus* são bactérias gram positivas que crescem em condições aeróbicas e anaeróbicas. Habitam principalmente as mucosas, podendo causar infecções de pele, alimentares, pneumonia, sepse e endocardite. O *S. aureus* Meticilina Resistente (MRSA) estão entre os isolados que mais causam infecções nosocomiais, na comunidade, na produção animal, devido ao crescente aumento nos relatos de

resistência a multidrogas, o que prejudica a eficácia dos antimicrobianos (CHUKWUNONSO et al., 2018).

Essas bactérias estão entre as mais estudadas para entender a complexidade adaptativa em virtude da pressão seletiva do tratamento antimicrobiano. O uso, a longo prazo, de antimicrobianos pode ser o pivô para o crescente número de mecanismos bioquímicos e genéticos que afetam na ação do antimicrobiano. O desenvolvimento de resistências destes patógenos pode ocorrer via alteração do sítio ativo, elementos genéticos móveis, inativação enzimática, sequestro de agentes antimicrobianos e bomba de efluxo (BITRUS et al., 2018).

A bomba de efluxo, nesse sentido, é importante para a sobrevivência bacteriana na era dos antimicrobianos. Esse mecanismo de resistência envolve um sistema que expelle o agente antimicrobiano, por meio de um gradiente de prótons da célula, uma vez que passa pela membrana ou entra no citosol. Isso pode ocorrer para uma classe, como a TetK para tetraciclinas ou o MsrA para macrolídeos, bem como múltiplas classes de antimicrobianos (MES – *Multidrug efflux systems*), como o Nor A de *S. aureus*. Observa-se então, que a bomba de efluxo constitui um promissor alvo terapêutico para a descoberta e desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos e inibidores de bomba (LAMUT et al., 2019).

Os inibidores de bomba de efluxo (IBE) constituem uma boa estratégia para controle da resistência, podendo, inclusive, restaurar a susceptibilidade do antibacteriano, além de aumentar a potência e espectro de ação (LAMUT et al., 2019). Vários inibidores têm sido testados, como o CCCP, que se mostrou boa atividade de inibição (BARON e ROLAIN, 2018).

Os produtos naturais também constituem ferramentas para descoberta de novos inibidores de bomba de efluxo, pois apresentam potencial de otimização e uso futuro no tratamento (STAVRI, PIDDOCK e GIBBONS 2007). Estes inibidores podem contribuir significativamente para o resgate da sensibilidade de antimicrobianos que, devido à resistência, estavam em desuso (SEUKEP et al., 2020). A  $\beta$ -lapachona e oxima do lapachol estão entre as substâncias promissoras na reversão e controle de *S. aureus* multirresistente, podendo, então, servirem como modelo de estudo na busca de inibidores de bomba de efluxo e controle de infecções causadas por patógenos de difícil erradicação (FERNANDES et al., 2020).

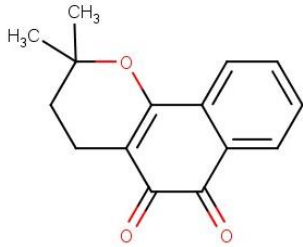
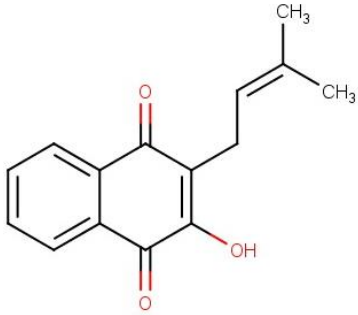
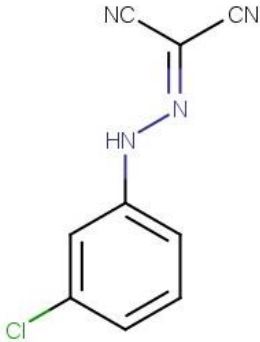
## **Metodologia**



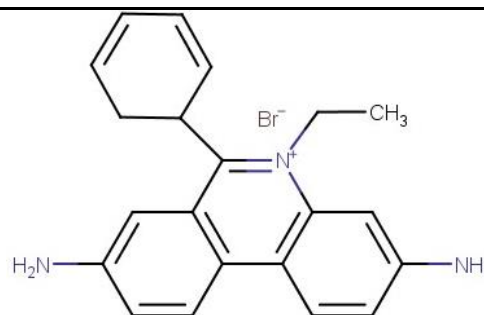
## Obtenção dos derivados do Lapachol

A  $\beta$ -lapachona (PF: 154-155 °C;) e a oxima do lapachol [PF 156-158 °C;  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  9,0 (m, 1H); 8,2 (m, 1H); 7,6 (m, 2H); 5,2 (m, 1H); 3,3 (dd, J 6,7 Hz; 2H); 1,8 (s, 3H); 1,6 (s, 3H) --  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  183,1; 139,9; 132,1; 131,1; 130,7; 129,7; 126,3; 126,0; 121,9; 121,3; 117,1; 25,0; 21,9; 17,0] foram sintetizados pelo Grupo de Química Aplicada a Farmácia (GQAF) da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. As substâncias foram obtidas a partir da modificação molecular do produto natural a fim de potencializar a atividade biológica das moléculas de origem natural (**Tabela 1**) (ARAÚJO et al., 2014).

**Tabela 1.** Estrutura química da  $\beta$ -lapachona, oxima do lapachol e CCCP.

Substância	Estrutura Química
<p><math>\beta</math>-lapachona</p> <p>(3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto-(1,2b)-pirano-5,6-diona)*</p>	
<p>Oxima do lapachol</p> <p>(1,4-naftalenodiona, 2-hidroxi-3-(3-metil-2-buten-1-il)-1-oxima)*</p>	
<p>CCCP</p> <p>Carbonil Cianeto m-Clorofenilhidrazona</p>	

Brometo de Etídio (BrEt)



\*Adaptado de ARAÚJO et al., 2014.

## Atividade biológica e antibacteriana

### Linhagens bacterianas utilizadas

Um isolado clínico de *Staphylococcus aureus*, caracterizado com métodos bioquímicos (Catalase; Oxidase; PAB; Coagulase e DNase) e molecular (*mecA*), foi utilizado nos procedimentos. Esse foi isolado de mastite clínica com o uso recorrente de enrofloxacin (ENR) e que compunha o rebanho da Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Caprinocultura, da Universidade Federal de Viçosa/MG/Brasil localizada no município de Viçosa-Brasil (20.7467991 S 43.0193046 W - SisGen AEB34A6). O micro-organismo é mantido em cultura (BHI Agar - *Brain Heart Infusion*) e conservado sob refrigeração (4°C) no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), localizado no Campus Ciências Agrárias em Petrolina/PE/Brasil, sendo repicados no intervalo de 15-30 dias para manutenção da viabilidade das colônias.

### Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram realizadas as análises da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM) a partir das descrições do protocolo M07-A9 (CLSI, 2014). Para os compostos semissintéticos foi realizada uma microdiluição seriada. Para tanto, uma solução mãe à 300 µg/mL foi preparada utilizando DMSO como diluente (1:2) (FERNANDES et al., 2020) e obtenção das concentrações 0,29 - 150 µg/mL.

### Ensaio de bomba de efluxo

Primeiramente o isolado clínico foi avaliado qualitativamente pelo método de Cartwhell de Brometo de Etídio Agar, que avalia a capacidade das células em reter ou

expulsar o BrEt após incubação de 24hs. Posteriormente, ajustado na escala de 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) a partir de uma solução padrão. As placas de BHI ágar foram preparadas com 0 e 1 mg/mL de BrEt e protegidas da luz. O isolado foi cultivado seguindo um padrão radial de cultivo. Esse método avalia indiretamente a atividade de efluxo para que, em seguida, tenha-se uma identificação de isolados de *S. aureus*. Após a incubação a 37 °C por 24 horas as microplacas foram submetidas à análise sob luz ultravioleta. A ausência de fluorescência no poço indica presença de mecanismo de efluxo (adaptado de MARTINS et al., 2011). Para os ensaios de inibição foram utilizadas concentrações sub-inibitórias da CIM.

### **Atividade de inibição de bomba de efluxo por redução da CIM do BrEt**

Em uma microplaca de 96 poços foi feita a preparação contendo o  $\frac{1}{4}$  da CIM do BrEt (150  $\mu\text{g/mL}$  de meio), com 10  $\mu\text{L}$  do inóculo na escala de 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Para atividade do CCCP e das substâncias ( $\beta$ -lapachona e da oxima do lapachol) como inibidores de bomba de efluxo foram testadas com  $\frac{1}{2}$  CIM dos compostos CCCP (31,24  $\mu\text{g/mL}$ ),  $\beta$ -lapachona (1,17  $\mu\text{g/mL}$ ), oxima do lapachol (18,75  $\mu\text{g/mL}$ ). No controle foi utilizado a CIM das substâncias e o  $\frac{1}{4}$  da CIM do BrEt. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a 37°C. A emissão de fluorescência foi avaliada após esse intervalo. A revelação da CIM foi feita utilizando 10  $\mu\text{L}$  de resazurina, sendo a mudança da cor do meio de azul para vermelho é indicativo da presença de crescimento bacteriano. A redução da CIM do BrEt é indicativo de inibição de bomba de efluxo. Os dados foram plotados em planilha para posterior análise. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas (adaptado de ABD EL-BAK et al., 2019).

### **Docking molecular e construção do modelo NorA**

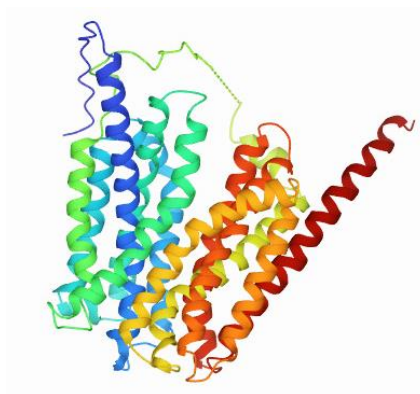
O transportador glicerol 3- fosfato (**Figura 1**) foi obtido do banco de dados de proteína ou *Protein Data Bank* - PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) com o código 1PW4.

As estruturas do brometo de etídio,  $\beta$ -lapachona, da oxima do lapachol e CCCP foram submetidas ao *docking* molecular usando o Molegro Virtual Docker<sup>®</sup>, versão 6.0.1 (MVD). Todos os compostos de água, ligantes e interações foram retirados da estrutura original da enzima. O procedimento de acoplamento foi realizado utilizando uma GRID de 15 Å de raio e resolução de 0,30 para cobrir o local de ligação das

estruturas das enzimas. O modelo de encaixe foi usado para focar a pesquisa em poses similares às interações e conformação do ligante. O algoritmo de escore de MolDock foi usado como a função de escore. O local de ligação era o mesmo que o ligante presente no arquivo PDB.

### Análises Estatísticas

As análises foram realizadas no programa GraphPadPrism5<sup>®</sup>. Os dados foram plotados e em seguida foi realizado o teste One-way ANOVA (*no-parametric*) com pós-teste de Tukey. As médias foram ditas com diferença estatística, utilizando o intervalo de confiança de 95%, com valor de  $p < 0,05$ .



**Figura 1.** Estrutura da proteína 1PW4 (transportador glicerol-3-fosfato) em 3D obtidas da plataforma PDB (*Protein Data Bank*) utilizados no *docking* molecular.

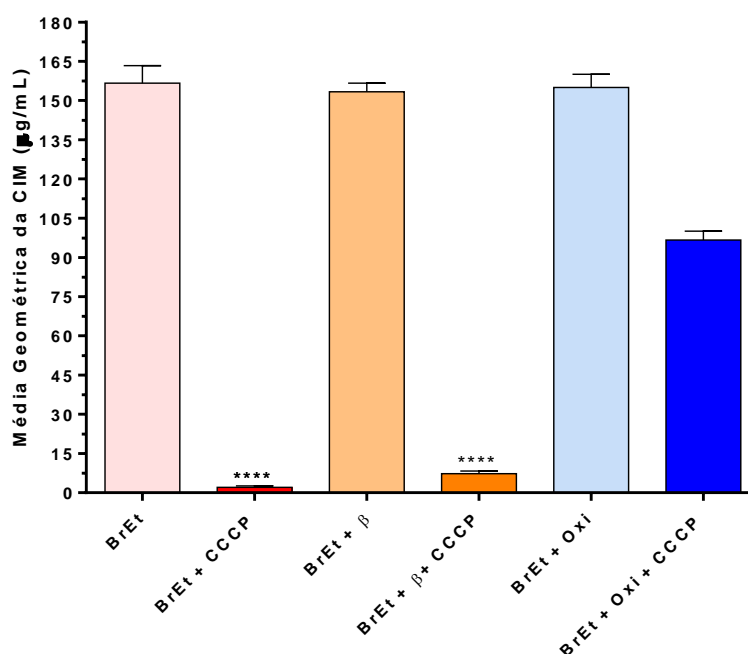
### Resultados e Discussão

Das bactérias utilizadas no ensaio de crescimento em placa contendo BrEt apenas um isolado identificado como 05 apresentou atividade sugestiva de bomba de efluxo. Dado esse observado na ausência de fluorescência quando submetido a luz UV. Dessa forma, esse patógeno foi utilizado como modelo para os testes posteriores. Em relação aos derivados semissintéticos,  $\beta$ -lapachona e da oxima do lapachol, todos apresentaram atividade antibacteriana para os isolados testados, incluindo o isolado de *S. aureus* bacteriano 0,5, com valores 2,34 e 75  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Ao iniciarmos a análise dos resultados precisamos compreender a atividade do CCCP em inibir a bomba de efluxo e permitir que o brometo de etídio (BrEt) consiga causar danos a bactéria. Nessa hipótese, deve-se salientar que apenas um isolado, *S. aureus* identificado como “05”, apresentou atividade de bomba de efluxo, ausência de fluorescência, sendo utilizado para os ensaios de inibição. Como podemos ponderar no

(Gráfico 1) que o inibidor de bomba de efluxo reduziu a CIM do BrEt (156,7 - 2,08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), justificando a ação do CCCP, ou seja, o patógeno ficou mais susceptível a presença do agente fluorescente.

O ensaio com BrEt é um dos estudos mais realizados para avaliação da atividade de inibição de bomba. Ele é um substrato para o sistema de efluxo MDR e a atividade pode ser mensurada pela medida de fluorescência (STAVRI, PIDDOCK e GIBBONS, 2007). O método realizado neste trabalho permite o rastreamento da atividade de bomba de efluxo bacteriana a partir da premissa de que a redução da CIM do BrEt, presente no meio, no qual as bactérias emitem fluorescência da extrusão do fluorocromo (LU et al., 2020).



**Gráfico 1.** Análise de inibição da atividade de bomba de efluxo utilizando Brometo de etídio (BrEt),  $\beta$ -lapachona, da oxima do lapachol e CCCP . \*\*\*\*Com  $p < 0,0001$ .

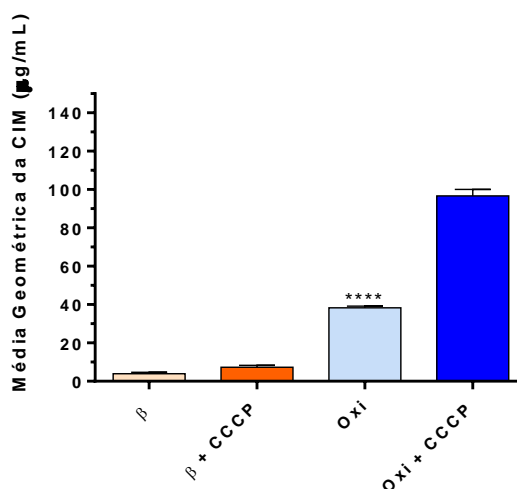
Nesse caso o CCCP aumenta a concentração do BrEt no interior da bactéria, potencializando o efeito da droga. A exposição de *S. aureus* a compostos, como o brometo de etídio pode modular a ação de resistência por bomba de efluxo. A NorA, juntamente com a QacA e QacB, constituem bombas de fluxo bem caracterizadas nessa espécie de bactéria, sendo regulada negativamente pelo Mgr (antigamente NorR), relacionada à resistência as fluorquinolonas, tetraciclinas e alguns compostos químicos, como o brometo de etídio. O transportador SdrM também é responsável pela resistência a alguns antimicrobianos, incluindo o BrEt em MRSA (LEKSHMI et al., 2018).

Por ser um inibidor não específico de bomba de efluxo o CCCP apresenta uma boa atividade na restauração da susceptibilidade pelo brometo. Todavia isso não permite identificar a proteína responsável pela extrusão. Alguns trabalhos sugerem que o CCCP afeta a polarização da membrana plasmática da bactéria, além da redução da produção de ATP (adenosina tri-fosfato), importante para o mecanismo de extrusão, o que pode justificar sua ação em isolados resistentes na presença de compostos com ação antimicrobiana (BARON e ROLAIN, 2018).

Quando analisamos a atividade da  $\beta$ -lapachona e da oxima do lapachol (**Gráfico 1**), observamos que não houve alteração no gráfico na presença do BrEt. A ausência de atividade, redução da CIM do BrEt, indica que o mecanismo de inibição de bomba não é intrínseco das substâncias estudadas. Fato esse que é comprovado quando comparamos a atividade do CCCP, que, apesar da ausência de atividade antimicrobiana, apresenta ação inibitória de bomba. Isso é uma vantagem dos inibidores eficazes uma vez que pode evitar a seleção de isolados resistentes (BHARDWAJ e MOHANTY, 2012).

Todavia, apesar da ausência do resultado de IBE, quando combinamos a  $\beta$ -lapachona e oxima do lapachol com o CCCP obtemos algumas considerações importantes (**Gráfico 1**). Na associação BrEt +  $\beta$ -lapachona + CCCP podemos inferir que o provável a ação antibacteriana da  $\beta$ -lapachona não está relacionada aos mecanismos de resistência por bomba de efluxo, sugerindo que esse composto pode ser útil no controle de infecções por *S. aureus* (FERNANDES et al. 2020).

Quando analisamos a atividade combinada da oxima (BrEt + Oxi + CCCP) observamos uma mudança significativa da ação antimicrobiana na presença do inibidor. No **Gráfico 2** houve um aumento da CIM da oxima, ou seja, redução à atividade antimicrobiana, prejudicando, assim sua ação frente ao micro-organismo. Tal fenômeno sugere que a o mecanismo de ação da oxima possa estar relacionado à resistência intrínseca por bomba de efluxo ou, por uma competição entre as moléculas (Oxima e CCCP) pelo sítio ativo da proteína (**Figura 2 E**).



**Gráfico 2.** Interferência na atividade antimicrobiana da  $\beta$ -lapachona e da oxima do lapachol na presença do CCCP. \*\*\*\*Com  $p < 0,0001$ .

Baron e Rolain (2018) avaliaram a susceptibilidade de isolados bacterianas a colistina na presença do inibidor de bomba de efluxo, o CCCP. Para os autores o uso desses compostos pode ser uma boa alternativa para reverter a resistência à drogas antimicrobianas, como a colistina, em *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia*. O efeito foi mais significativo na resistência intrínseca e heteroresistência, sugerindo que o mecanismo de bloqueio pelo CCCP é crucial para o desenvolvimento de resistência. A hipótese para tal resultado está, provavelmente, na redução do ATP e, conseqüentemente, na atividade da bomba de efluxo.

Sabe-se que esse mecanismo de resistência pode levar a graves problemas clínicos tanto em âmbito hospitalar como na comunidade. As bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os patógenos que mais causam infecções devido ao potencial de virulência e diversidade de mecanismos de resistência, incluindo o sistema de bomba de efluxo. Isso prejudica a eficácia do antimicrobiano, resultando na geração de fenótipos resistentes à múltiplas drogas. Além disso, tal fenômeno pode gerar a co-seleção e resistência cruzada entre antimicrobianos, particularmente preocupante quando nos referimos a isolados de MRSA (COSTA et al., 2013).

Diante desse problema novas moléculas ou associações estão sendo desenvolvidas. Os produtos naturais são, portanto, alternativas terapêuticas para o incremento de ensaios cujo foco está na reversão de resistência aos antimicrobianos utilizados na prática clínica. A reserpina é um exemplo, porém possui ação neurotóxica em concentrações inibitórias de bomba. Logo, estudos detalhados envolvendo aspectos

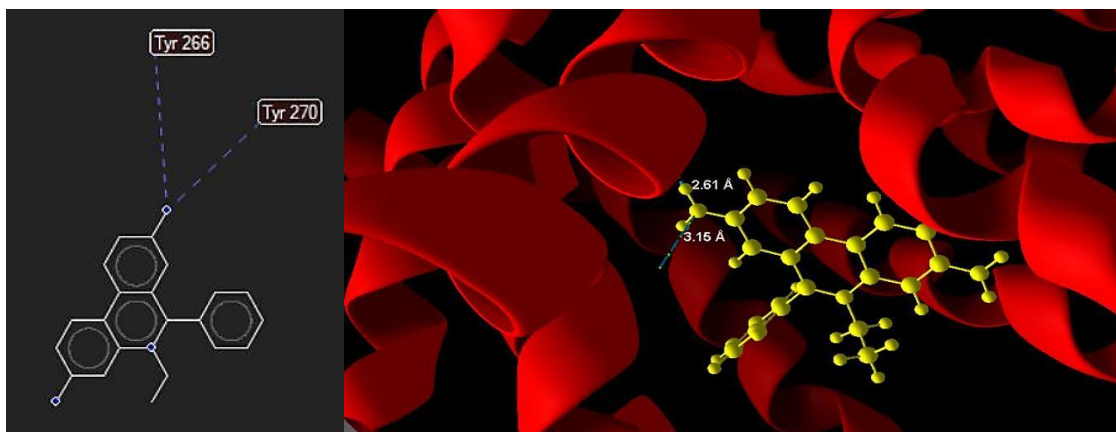
farmacocinéticos e farmacodinâmicos, bem como análises toxicológicas devem ser requeridos quando se trata do potencial de IBE (STAVRI, PIDDOCK e GIBBONS, 2007).

O benefício das análises *in silico* é o conhecimento das interações entre os ligantes e os alvos, o que serve como importante critério de exclusão, especialmente após a validação através de testes *in vitro* como a determinação da CIM, os ensaios de *checkerboard* e de fluorescência (SEUKEP et al., 2020). É interessante notar que o desenvolvimento de moléculas IBE requer uma otimização estrutural que permita uma ação mais efetiva. A estratégia básica consiste em permitir uma inibição da proteína e, ao mesmo tempo, auxiliar na terapia antimicrobiana. A demonstração convincente da capacidade de alguns agentes farmacológicos ou moléculas naturais para restaurar a atividade antimicrobiana estimula a pesquisa de novos IBE. Desses, alguns são análogos de classes de antimicrobianos, como quinolonas, tetraciclinas e aminoglicosídeos, minimizando o efluxo dos fármacos correspondentes. Isso é justificado pela presença de anéis aromáticos e porções ionizáveis, que influenciam nas ligações intermoleculares com as cadeias laterais de aminoácidos (BAMBEKE, PAGÉS e LEE, 2010).

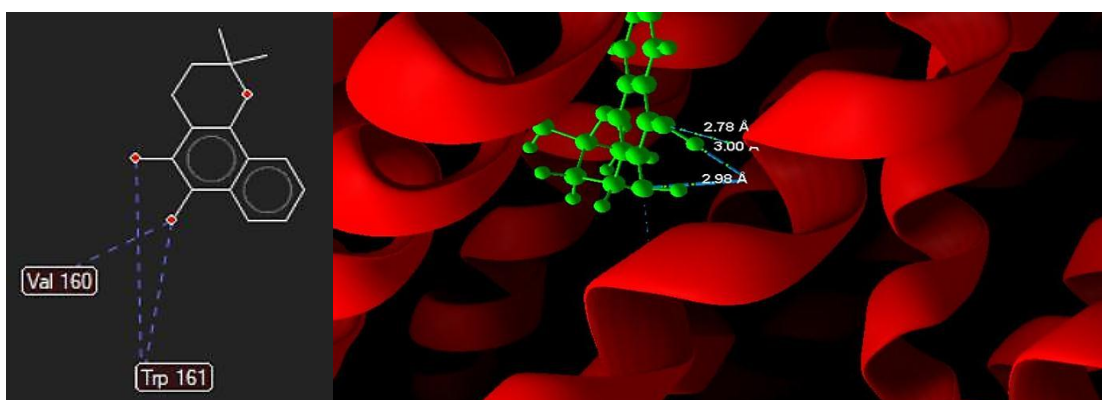
Na **Figura 2** mostra as interações dos compostos utilizados no trabalho, com o objetivo de verificar essas ligações intermoleculares. Abd El-Baky e colaboradores (2019) realizam o *docking* molecular utilizando a glicoproteína P (1PW4), uma bomba de efluxo do tipo MDR, utilizada neste estudo como estrutura representativa da superfamília de transportadores de efluxo em *S. aureus*.

Alguns estudos sugerem essa proteína como modelo de superfamília de facilitadores (MFS) para estudos de *docking* molecular. Transportadores MFS apresentam 12 domínios transmembrana do tipo  $\alpha$ -hlice conectados dobramentos hidrofílicos do tipo amino e carboxila no terminal citoplasmático. Dessa forma, a proteína 1PW4 serve de modelo para análise do transportador NorA em *S. aureus* devido a homologia conformacional (ABD EL-BAKY et al., 2019; BHASKAR e BABU 2016).

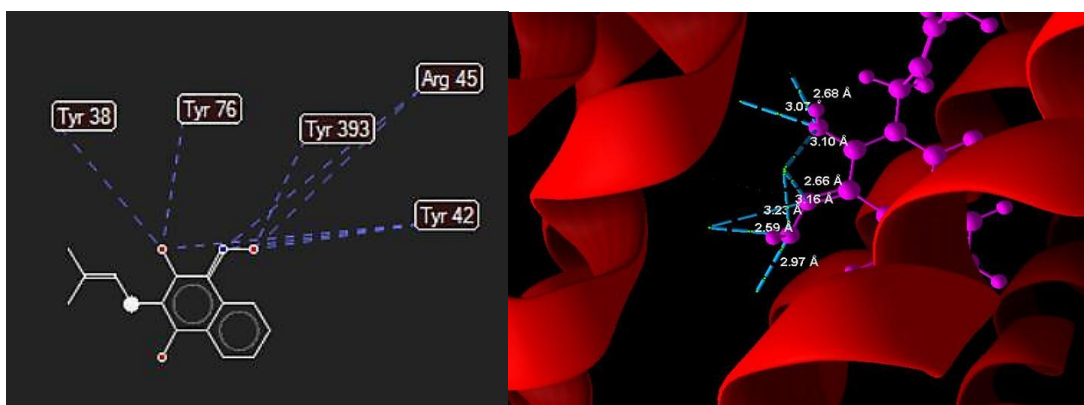




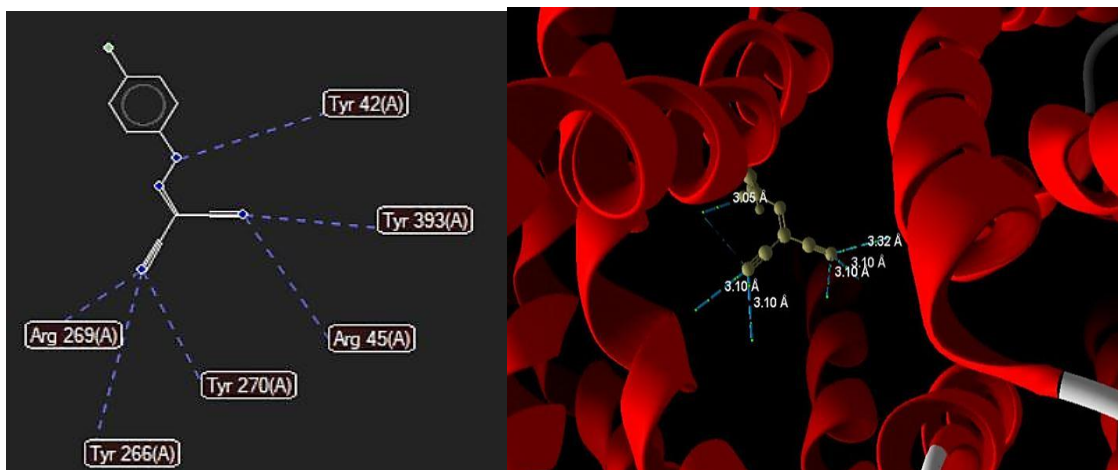
[A] Brometo de etídio (BrEt) interagindo com os aminoácidos no sítio ativo da proteína 1PW4.



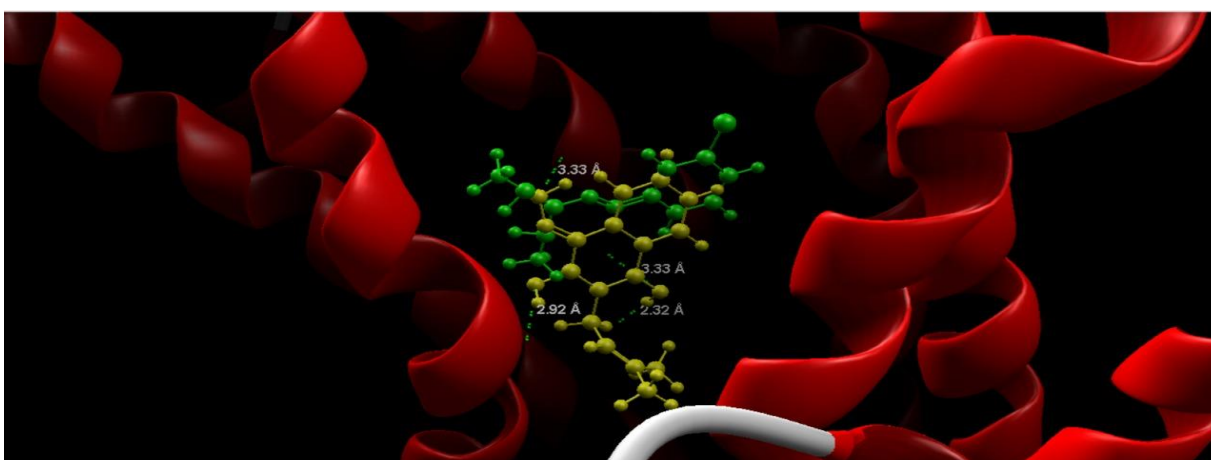
[B]  $\beta$ -lapachona interagindo com os aminoácidos no sítio ativo da proteína 1PW4.



[C] Oxima do Lapachol interagindo com os aminoácidos no sítio ativo da proteína 1PW4.



[D] CCCP interagindo com os aminoácidos no sítio ativo da proteína 1PW4.



[E] Interação no mesmo sítio ativo da proteína 1PW4 entre o CCCP (verde) e oxima do lapachol (amarelo).

**Figura 2.** Análise de *docking* molecular do BrEt,  $\beta$ -lapachona, oxima do lapachol e CCCP, mostrando os sítios de interação com os aminoácidos da proteína 1PW4 bem como suas respectivas energias eletrostáticas.

Verifica-se, ao longo do texto, que a oxima do lapachol apresentou interações importantes que justificam a influência e inibição da proteína 1PW4. Na **Figura 2** mostra as interações entre os aminoácidos presentes no local de ancoragem, revelando a orientação dos possíveis modos no sítio da proteína. Os ensaios mostram complexos proteicos ligados à ligantes. A energia de ligação do BrEt foi a mais espontânea, quando comparamos os valores de energia das outras substâncias em estudo (**Tabela 2**). Vale salientar que quando mais negativa a energia, melhor é a espontaneidade de interação com o sítio efetor (ABD EL-BAKY et al., 2019).

**Tabela 2.** Valores de energia eletrostática (livre) em kJ/mol das substâncias em estudo.

Substância	Energia Eletrostática (kJ/mol)
β-lapachona	- 86,49
Oxima do lapachol	- 91,14
CCCP	- 75,58
BrEt	- 99,67

Guz e colaboradores (2001) realizaram um estudo com flavonolignana e flavona, como inibidores de bomba em *S. aureus* multirresistente. Os autores fizeram uma relação estrutura atividade e concluíram que as propriedades lipofílicas e as interações de hidrogênio nas moléculas contribuem para melhorar a afinidade pela 1PW4.

A oxima do lapachol possui três sítios de interação comuns com a proteína 1PW4 (Tyr 393, Tyr 42 e Arg 45), quando comparamos com o CCCP. Isso pode justificar o valor de energia livre maior, em módulo, da oxima. Porém, quando confrontadas, é observado que ambas as substâncias interagem no mesmo sítio ativo da proteína em questão, o que poderia inviabilizar seu uso em combinação, objetivando uma possível associação para potencializar o efeito de inibição de bomba (**Figura 1 E**).

Tais interações moleculares favorecem a orientação estrutural capaz de estabilizar as ligações com os aminoácidos de forma estável, como podemos notar nos valores de energia eletrostática e atividade de inibição de bomba por redução da CIM, o que torna uma molécula promissora para estudos de inibição de bomba de efluxo (**Tabela 2**).

Dessa forma, é possível constatar a relevância clínica da bomba de efluxo, que pode contribuir para a susceptibilidade dos patógenos aos antimicrobianos. A resistência intrínseca pode ser baixa ao ponto de a bactéria ser sensível a terapia. Contudo o micro-organismo ainda pode ser suscetível se a bomba for não funcional, permitindo que baixas doses do antimicrobiano sejam efetivas no tratamento. Se não fosse essa característica de resistência, o espectro de alguns antimicrobianos seria estendido. Dentre as estratégias utilizadas para reduzir a ineficácia de alguns antimicrobianos estão a pesquisa de compostos com características estruturais semelhantes aos IBE e o desenvolvimento de agentes terapêuticos que podem ser utilizados em combinação com antimicrobianos existentes para aumentar a potência (LAMOVSKEYA e WATKINS 2001).

## Conclusão

Verifica-se, portanto, que a extrusão de drogas antimicrobianas está diretamente relacionada à eficácia dos antimicrobianos. Novas oportunidades de controlar a resistência a medicamentos de uso clínicos são necessárias. Há necessidade de esforços contínuos para desenvolver alternativas terapêuticas que permitam combinações benéficas e de baixa toxicidade, bem como características farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Além do mais, o efeito combinatório de drogas com IBE permite uma redução da pressão seletiva no surgimento de isolados resistentes e melhora no quadro clínico de pacientes com infecções graves.

## Referencial Bibliográfico

- ABD EL-BAKY, R. M., Abuo-Ranhma, G. E-D. A. Sandle, T., Hetta, H. F. A novel mechanism of action of ketoconazole: inhibition of the NorA efflux pump system and biofilm formation in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 1704-1718, 2019.
- ARAÚJO, C. R. M. et al. Síntese e Determinação in vitro do FPS-UVB de oximas Derivadas do Lapachol . **Rev. Virtual de Química**, v. 6, n. 6, p. 1702-1712, 2014.
- BAMBEKE, F. V., PAGÉS, J-M. e LEE, V. J. Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibacterial Therapy and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. **Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery**, 1, 138-175, 2010.
- BARON S. A., ROLAIN J-M. Efflux pump inhibitor CCCP to rescue colistin susceptibility in mcr-1 plasmid-mediated colistin-resistant strains and Gram-negative bacteria. **J Antimicrob Chemother**, 73: 1862–1871, 2018.
- BHARDWAJ, A. K.; MOHANTY, P. Bacterial efflux pumps involved in multidrug resistance and their inhibitors: rejuvenating the antiCIMicrobial chemotherapy. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, v. 7, n. 1, p. 73–89, 2012.

- BHASKAR, B. V. e BADU, T. M. Homology modeling, molecular dynamics, and virtual screening of NorA efflux pump inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 10, p. 3237–3252, 2016.
- BITRUS, A. A., O. M. Peter, M. A. Abbas and M. D. Goni.. *Staphylococcus aureus*: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms. **Veterinary Sciences: Research and Reviews**, 4(2): 43-54, 2018.
- CHUKWUNONSO, E. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: A Mini Review. **Int J Med Res Health Sci**, 7(1): 122-127, 2018.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility. Approved standard M27-A3**, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2014.
- COSTA, S. S. et al. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. **The Open Microbiology Journal**, 7, (Suppl 1-M5) 59-71, 2013.
- FERNANDES A. W. C et al. Anti-biofilm Effect of  $\beta$ -Lapachone and Lapachol Oxime Against Isolates of *Staphylococcus aureus*. **Current Microbiology**, v. 77, p. 204–209, 2020.
- GUZ, N. R.; STERMITZ, F. R.; JOHNSON, J. B.; BEESON, T. D.; WILLEN, S.; HSIANG, J.-F.; LEWIS, K. Flavonolignan and flavone inhibitors of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance pump: structure–activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 261–268, 2001.
- LAMOVSKEYA, O. e BOSTIAN, K. A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic—A vision for applied use. **Biochemical Pharmacology**, 71, 910-918, 2006.
- LAMOVSKEYA, O., WATKINS, W. J. Efflux Pumps: Their Role in Antibacterial Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry** 8, 1699-1711, 2001.
- LAMUT, A. et al. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. **Med Res Rev**. 1–45, 2019.

- LEKSHMI M. et al. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. **AIMS Microbiology**, 4, 1, 1–18, 2018.
- LU W-J et al. Determination of Drug Efflux Pump Efficiency in Drug-Resistant Bacteria Using MALDI-TOF MS. **Antibiotics**, 9, 639, 1-20, 2020.
- MARTINS, M. et al., Identification of Efflux Pump-mediated Multidrug-resistant Bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method. **In vivo**, 25, 171-178, 2011.
- SEUKEP, A. J. et al. Plant-derived secondary metabolites as the main source of efflux pump inhibitors and methods for identification. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 10, 277-290, 2020.
- STAVRI M., PIDDOCK L. J. V. e GIBBONS S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 59, 1247–1260, 2007.

## **7. CAPÍTULO 4 - Efeito Sinérgico, design *in silico* e nanoencapsulamento da $\beta$ -lapachona e oxima do lapachol na supressão da resistência em MRSA**

**Antonio Wilton Cavalcante Fernandes<sup>1\*</sup>; Edilson do Carmo Marins Júnior<sup>2</sup>;  
Márcio Rennan Santos Tavares<sup>3</sup>; Cleônia Roberta Melo Araújo<sup>4</sup>; Helinando  
Pequeno de Oliveira<sup>5</sup>; Mateus Matiuzzi da Costa<sup>6</sup>.**

*1 – Biociências da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.*

*2 – Acadêmico de biologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.*

*3 – Professor do Instituto Federal do Sertão Pernambucano – Petrolina*

*4 – Professor Adjunto do colegiado de Farmácia da Universidade Federal do Vale do São Francisco.*

*5 - Professor Associado do Colegiado de Engenharia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.*

*6 - Professor Associado do Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.*

### **\*Autor correspondente:**

Antonio Wilton Cavalcante Fernandes

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina/PE/Brasil.

E-mail: [awcf23@gmail.com](mailto:awcf23@gmail.com)

### **Resumo**

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) estão entre os patógenos mais prevalentes nas infecções hospitalares. A pressão seletiva do antimicrobiano faz com que novas opções terapêuticas sejam implementadas no sistema de saúde. Os produtos naturais constituem alternativas terapêuticas para o tratamento dessas infecções. A combinação e o microencapsulamento possibilitam um viés no sucesso da terapia. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade sinérgica, design *in silico* e microencapsulamento da  $\beta$ -lapachona, oxima do lapachol na supressão da resistência em MRSA. Foi realizada a avaliação da atividade antimicrobiana, tanto das substâncias como da forma microencapsulada, frente a oito isolados clínicos de MRSA a partir do método de microdiluição em caldo. A associação dos compostos com ciprofloxacina,

gentamicina e oxacilina foi realizada pelo método do *Checkerboard*. O *design in silico* foi realizado no programa *Molegro Virtual Docker*, versão 6.0.1 (MVD). A CIM variou de 4,68-18,75µg/mL para a atividade antimicrobiana. No teste de sinergismo houve uma redução aproximadamente 98% da CIM do antimicrobiano. A análise de *docking* molecular permitiu compreender os possíveis sítios de interação com as proteínas-alvo. Nosso estudo sugere que a redução da CIM dos antimicrobianos em combinação com as substâncias pode ser uma alternativa promissora para o tratamento de infecções causadas por MRSA.

**Palavras-chave:** *Docking* molecular; Atividade antimicrobiana; Resistência antimicrobiana.

### **Abstract**

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are among the most prevalent pathogens in nosocomial infections. The selective pressure of the antimicrobial causes new therapeutic options to be implement in the health system. Natural products are therapeutic alternatives for the treatment of these infections. The combination and microencapsulation enable a bias in the success of the therapy. The objective of the work was to evaluate the synergistic activity, in silico design and microencapsulation of β-lapachone, lapachol oxime in the suppression of resistance in MRSA. An evaluation of the antimicrobial activity, both of the substances and of the microencapsulated form, was carried out against eight clinical isolates of MRSA using the broth microdilution method. The association of the compounds with ciprofloxacin, gentamicin and oxacillin was performed using the Checkerboard method. The in silico design was performed using the Molegro Virtual Docker program, version 6.0.1 (MVD). The MIC varied from 4.68-18.75µg / mL for antimicrobial activity. In the synergism test, there was a reduction of approximately 98% in the MIC of the antimicrobial. The analysis of molecular docking allowed us to understand the possible sites of interaction with the target proteins. Our study suggests that reducing the MIC of antimicrobials in combination with the substances may be a promising alternative for the treatment of infections caused by MRSA.

**Keywords:** Docking molecular; Antimicrobial activity; Antimicrobial resistance.



## Introdução

O gênero *Staphylococcus* spp. causa muitas infecções no âmbito da medicina humana e veterinária, gerando um grande impacto à saúde. Esses colonizam, principalmente, pele e mucosas, além de outros tecidos e órgãos (Chukwunonso et al. 2018). Além disso, as bactérias deste gênero são especialistas em adquirir genes de resistência e virulência, o que aumenta seu potencial patogênico (BITRUS et al., 2018).

O gene *mecA* é um dos responsáveis pela resistência destes micro-organismos, sendo, então, classificados, geneticamente, como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina). Isso acontece devido à expressão de uma proteína que confere ação frente ao antimicrobiano da classe dos  $\beta$ -lactâmicos. Tal fato é consequência do uso errôneo na terapêutica humana e veterinária, o que tem favorecido a pressão seletiva, resultando em espécies bacterianas cada vez mais multirresistentes (ALTIERI et al., 2013; ATIQUÉ et al., 2012).

Esse fenômeno tem gerado desinteresse por parte da indústria farmacêutica em relação ao desenvolvimento de novos antimicrobianos, já que existe uma grande dificuldade em encontrar fármacos ativos e com propriedades farmacocinéticas aceitáveis e seguras (TACCONELLI et al., 2018). Dentre as alternativas para conter o fenômeno da resistência aos antimicrobianos está a combinação sinérgica entre compostos com potencial antimicrobiano e produtos naturais (RIBEIRO et al., 2016). Outra forma de controle da resistência é a nanoencapsulação com polímeros. Isso permite um aumento das propriedades físico-químicas dos compostos, bem como efetividade no mecanismo de ação (AGNIHOTRI, SOPPIMATH, BETAGERI, 2010).

O Eudragit® apresenta diversas propriedades, como solubilidade em solventes orgânicos, como acetona e propan-2-ol, constância na liberação de fármaco, que garantem sua importância para estudos envolvendo a utilização e melhoramento da ação de drogas de interesse farmacológico (BHILEGAONKAR e PARVATKAR, 2020; NIKAM et al., 2011).

Além dessa tecnologia, pode-se inferir que os produtos naturais, estão entes as novas alternativas terapêuticas para o desenvolvimento de drogas antimicrobianas, associadas ou não as técnicas de nano/microencapsulação. A síntese de novos fármacos, por exemplo, conduziu ao interesse na “redescoberta”, bem como no melhoramento da

eficiência do processo de síntese química com base nos compostos naturais (Taylor, 2013).

A  $\beta$ -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto-(1,2b)-pirano-5,6-diona) e a oxima do lapachol (1,4-naftalenodiona, 2-hidroxi-3-(3-metil-2-buten-1-il)-1-oxima) (Tabela 1), produtos semissintéticos do lapachol (2-hidroxi-3(3-metil-2-butenil)1,4-naftoquinona), isolado da espécie *Tabebuia avellaneda* Lor (Bignoniaceae), estão entre as substâncias promissoras na descoberta de compostos bioativos com ação antimicrobiana (FERNANDES et al., 2020). Dessa forma, sua atividade possibilita uma estratégia promissora para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções bacterianas.

## Metodologia

### $\beta$ -lapachona e oxima do lapachol

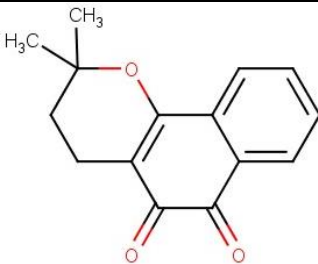
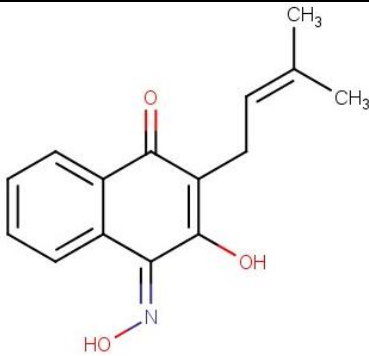
A  $\beta$ -lapachona (PF: 154-155 °C;) e a oxima do lapachol [PF 156-158 °C;  $^1\text{H}$  RMN:  $\delta$  9,0 (m, 1H); 8,2 (m, 1H); 7,6 (m, 2H); 5,2 (m, 1H); 3,3 (dd, J 6,7 Hz; 2H); 1,8 (s, 3H); 1,6 (s, 3H) --  $^{13}\text{C}$  RMN:  $\delta$  183,1; 139,9; 132,1; 131,1; 130,7; 129,7; 126,3; 126,0; 121,9; 121,3; 117,1; 25,0; 21,9; 17,0] foram sintetizados pelo Grupo de Química Aplicada à Farmácia (GQAF) da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. As substâncias foram obtidas a partir da modificação molecular do produto natural a fim de potencializar a atividade biológica das moléculas de origem natural previamente sintetizados por Araújo e colaboradores (2014) (Tabela 1).

### Isolados bacterianas

Os isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* (no total de 8), incluindo a ATCC (25923) foram caracterizados com métodos bioquímicos (Catalase; Oxidase; PAB; Coagulase e DNase) e moleculares (*mecA*). A classificação desses foi a seguinte: Hospital Universitário Veterinário – HUV/UNIVASF (identificação: 143, 154 e 242), Hospital de Urgências e Traumas – HUT/UNIVASF (identificação: A1, E5 e I9) e um isolado de mastite bovina (identificação: 78). Todos foram positivos para o gene *mecA*, exceto o isolado 78 e a isolado padrão de *S. aureus* ATCC (25923). O perfil de susceptibilidade e resistência para os antimicrobianos (ciprofloxacina, gentamicina e oxacilina) estão descritos na Tabela 2. Os micro-organismos foram mantidos em culturas (BHI Agar - *Brain Heart Infusion*) e conservados sob-refrigeração (4°C) no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Universidade Federal do Vale do São

Francisco (UNIVASF), localizado no Campus Ciências Agrárias em Petrolina/PE/Brasil, sendo repicados no intervalo de 15-30 dias para manutenção da viabilidade das colônias.

**Tabela 1.** Estrutura química da  $\beta$ -lapachona e oxima do lapachol.

Substância	Estrutura Química
<p><math>\beta</math>-lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto-(1,2b)-pirano-5,6-diona)*</p>	
<p>Oxima do lapachol (1,4-naftalenodiona, 2-hidroxi-3-(3-metil-2-buten-1-il)-1-oxima)*</p>	

\*Estrutura disponibilizados pelo Grupo de Química Aplicada a Farmácia (GQAF) da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF (ARAÚJO et al., 2014).

### Micropartículas de Eudragit® contendo $\beta$ -lapachona e oxima do lapachol

A nanoencapsulação foi feita com Eudragit® E100. Para isso, 7,5 mg das substâncias teste ( $\beta$ -lapachona e da oxima do lapachol) e 22,5 mg de Eudragit® E100 foram dissolvidos em aproximadamente 0,937 mL DMSO (Solução A-orgânica), sob agitação constante a temperatura controlada de 40 °C (SANTOS, 2013). Após a dissolução completa dos componentes. As soluções “A” e “B” foram misturadas, sendo “B” água destilada estéril. Para isso, a fase orgânica foi transferida gota a gota para um recipiente contendo aproximadamente 1,875 mL de solução aquosa, volume final de 2,8 mL (33,3% de DMSO). No final do processo obteve uma concentração aproxima da de 2,67 mg/mL da solução mãe.

## **Avaliação da Atividade Antimicrobiana**

Foram realizadas as análises da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM) a partir das descrições do protocolo M07-A9 (CLSI, 2014). Para os compostos semissintéticos se realizou uma microdiluição seriada, partindo de uma concentração inicial de 300 µg/mL (FERNANDES et al., 2020) e obtendo as concentrações 0,29 - 150 µg/mL. O diluente utilizado foi DMSO (1:2). Em relação aos antimicrobianos foram realizadas diluições na concentração inicial de 1000 µg/mL, exceto no teste com o isolado “I9”, no qual concentração inicial utilizada foi de 5000 µg/mL. Todos os antimicrobianos foram diluídos em água.

## **Método Checkerboard**

A análise de sinergismo foi realizada de acordo com Lee e colaboradores (2012). Inicialmente concentrações de 2x e 4x das substâncias e antimicrobiano, respectivamente foram utilizadas como “*work solution*”. Em seguida duas diluições seriadas foram realizadas, começando pelo antimicrobiano e depois pelo produto natural. Ao final obtém-se os valores nas linhas e colunas de 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16/ 1/32 da concentração equivalente a CIM. Ao final adicionou-se o isolado clínico na concentração de  $1 \times 10^5$  UFC/mL (10% do volume do poço – 10µL). As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. A interpretação do efeito sinérgico de cada antimicrobiano e das combinações foi determinada pelo cálculo do Índice da Fração Inibitória (IFI), que é a razão da concentração de CIM da substância combinada pela CIM da substância sozinha. A somatória dos IFIs (Antimicrobiano e Produto Natural) foi utilizada para a classificação dos efeitos: Ação sinérgica ( $IFI \leq 0,5$ ); Aditiva ( $0,5 < IFI \leq 1$ ); Indiferente ( $1 < IFI < 2$ ); Antagônico ( $IFI \geq 2$ ).

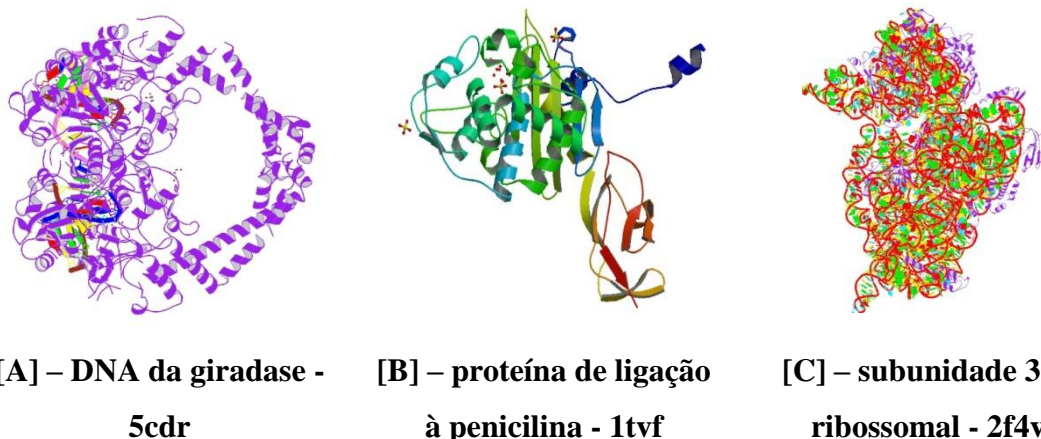
## **Docking molecular**

Os complexos enzima-inibidor de DNA da giradase (5cdr) [A], proteína de ligação a penicilina (1tvf) [B] e subunidade 30S ribossomal (2f4v) [C] (Figura 1) foram adquiridos do banco de dados de proteína ou *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Essas proteínas constituem os alvos moleculares dos antimicrobianos estudados, ciprofloxacina, oxacilina e gentamicina, respectivamente. As estruturas da β-lapachona e da oxima do lapachol foram submetidas ao *docking* molecular usando o Molegro Virtual Docker, versão 6.0.1 (MVD). Todos as moléculas, água, ligantes e interações foram retirados da estrutura

original da enzima. Essas estruturas proteicas e os compostos foram preparados usando as mesmas configurações de parâmetros no pacote de software. O procedimento de acoplamento foi realizado utilizando uma GRID de 15 Å de raio e resolução de 0,30 para cobrir o local de ligação das estruturas das enzimas. O modelo de encaixe foi usado para focar a pesquisa em poses similares às interações e conformação do ligante. O algoritmo de escore de MolDock foi usado como a função de escore.

### Análises Estatísticas

As análises foram realizadas no programa GraphPadPrism5.0®. Os dados foram plotados e em seguida foi realizado o teste One-way ANOVA (*no-parametric*) com pós-teste de Tukey. As médias foram ditas com diferença estatística, utilizando o intervalo de confiança de 95%, com valor de  $p < 0,05$ .



**Figura 1.** Estruturas em 3D obtidas da plataforma PDB (*Protein Data Bank*) dos alvos moleculares para os antimicrobianos (ciprofloxacina – A; oxacilina – B; gentamicina – C) utilizados no *docking* molecular.

### Resultados e Discussão

#### *Atividade antimicrobiana frente a isolados bacterianos*

A susceptibilidade antimicrobiana dos oito isolados clínicos de *S. aureus* foi mensurada pelo método de microdiluição em caldo. Os resultados da CIM

(concentração inibitória mínima) mostraram que apenas o isolado “I9”, positiva para a presença do gene *mecA*, apresentou resistência a todos os antimicrobianos utilizados, considerando os valores de breckpoint (**Tabela 2**). A CIM das substâncias variaram de 0,195-2500 µg/mL para a oxacilina, 0,024-25 µg/mL para a gentamicina e 0,024-50 µg/mL para o ciprofloxacina.

**Tabela 2.** Perfil de resistência dos isolados clínicos (valores de CIM).

Isolado de <i>Staphylococcus</i> spp.	Perfil de Resistência (µg/mL)		
	OXA	GEN	CIP
	≥4µg/mL*	≥16µ/mL*	≥4µg/mL*
<b>143</b> ( <i>mecA</i> positivo)	0,39	25	50
<b>154</b> ( <i>mecA</i> positivo)	0,195	0,024	0,024
<b>242</b> ( <i>mecA</i> positivo)	0,39	3,125	50
<b>A1</b> ( <i>mecA</i> positivo)	0,781	3,125	0,78
<b>E5</b> ( <i>mecA</i> positivo)	1,562	0,0487	0,39
<b>I9</b> ( <i>mecA</i> positivo)	2500	25	50
<b>78</b>	0,195	0,39	0,39
<i>Staphylococcus aureus</i> <b>ATCC 25923</b>	0,197	0,195	0,78

Densidade óptica do meio: 0,058. Os dados foram plotados como Média ± e.p.m (erro padrão da média); Oxa – oxacilina; CIP – ciprofloxacina; GEN – gentamicina; \**Breakpoint* (parâmetro para estabelecer se um micro-organismo é sensível ou resistente a uma terapia antimicrobiana) (CLSI, 2014; MERINO et al., 2009).

Pode-se dizer que as infecções MRSA tem se tornado um grande problema na saúde. Alguns β-lactâmicos, como cefalosporinas e carbapenêmicos tem sido utilizados em testes *in vitro* e mostrado efetividade contra esses isolados. As fluorquinolonas, por sua vez, não foram favoráveis em infecções de pele, principalmente, devido aos índices de resistência. Observa-se que tratamento para erradicação de infecções por *S. aureus* deve ser feito com base nos protocolos de controle de infecção, bem como na avaliação do risco-benefício do paciente (CHUKWUNONSO et al. 2018).

Essa crescente emergência de isolado s multirresistentes ameaçam populações susceptíveis no mundo. Isso possibilita a busca por novos compostos com atividade antimicrobiana. Sabe-se que antimicrobianos em concentrações sub-letais podem interferir com a expressão de fatores de virulência o que pode resultar tanto no alívio como no agravamento da infecção. Por isso a importância na seleção, com base nas

características farmacológicas e laboratoriais, de antimicrobianos na prática clínica (MU et al 2013).

Outro fator relevante é que a resistência a antimicrobianos em algumas espécies de *Staphylococcus* spp., como os resistentes a meticilina (MRSA), é vista como um perigo a saúde humana e animal. Isso é resultante do uso indiscriminado de antimicrobianos na prática clínica, uma vez que dificultam os tratamentos em animais, podendo, inclusive, ser transmitidos aos humanos por meio do leite e seus derivados contaminados, como é o caso da mastite causada por esse micro-organismo (ASLANTAS e DEMIR 2016).

A propósito, alternativas terapêuticas são necessárias, objetivando evitar a disseminação e a piora no quadro clínico das infecções na propriedade e comunidade. Tendo em vista que bactérias multirresistentes ou produtoras de biofilme representam um desafio no tratamento de infecções é notória a necessidade de encontrar alternativas no controle de MRSA (ABDALLAH et al., 2014). Os produtos naturais, dessa forma, estão entre as perspectivas do mercado farmacêutico. Em consonância com as organizações públicas, que também tem voltada a atenção a esse mercado, visando tanto à pesquisa acadêmica, como a preservação dos recursos naturais (TAYLOR, 2013).

Os resultados da CIM da  $\beta$ -lapachona e oxima do lapachol mostram atividade contra todos os isolados. Todavia apenas os isolados de *Staphylococcus* spp. identificados como “143”, “242” e “I9” foram utilizados na análise da atividade devido à resistência aos antimicrobianos utilizados (ver **Tabela 2**), o que aumenta a importância das substâncias em relação a característica frente à isolado s multirresistentes. O que observamos é uma redução em torno de 50% na CIM quando nanoencapsulamos a  $\beta$ -lapachona, já para a oxima do lapachol não houve diferença na atividade (**Tabela 3**).

O uso da técnica de nanoencapsulamento pode reduzir a toxicidade das substâncias. A  $\beta$ -lapachona se mostrou uma molécula promissora, porém apresenta efeito tóxico em uma variedade de células tumorais. A exposição *in vivo* pode levar a danos oxidativos imprevisíveis a depender da dose e via de administração (dose letal em ratos de 80 mg/Kg), podendo os animais apresentarem alterações hepáticas e renais.

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana das soluções  $\beta$ -lapachona, oxima do lapachol e micropartículas frente a isolados resistentes.

Isolado de	Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	$\beta$ -lapachona	Nano - $\beta$ -lapachona	% de Redução	oxima do lapachol	Nano - oxima do lapachol	% de Redução
<i>Staphylococcus</i> spp.						
<b>143</b>	9,375	4,487	47,8%	18,75	37,5	-*
<b>242</b>	18,75	9,375	50%	18,75	37,5	-*
<b>I9</b>	9,375	9,375	-*	75	75	-*

\*Entende-se por “-”, ausência de atividade.

Alguns estudos estão utilizando polímeros, como a quitosana, o que torna uma estratégia para melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de alguns compostos (OLIVEIRA et al., 2018).

A nanotecnologia, portanto, é uma ferramenta que possibilita ampla utilização, como na medicina, em infecções causadas por microrganismos resistentes ou produtores de biofilme. Somam-se a isso, novas estratégias como a conjugação de antimicrobianos em micropartículas, o que permite majorar a rapidez e liberação do princípio ativo, além de aperfeiçoar a eficácia frente ao microrganismo em questão (VARISCO et al., 2014).

O efeito combinado dos antimicrobianos (ciprofloxacina e gentamicina) com as substâncias estudadas se mostrou efetiva na atividade antimicrobiana. Para alguns isolados houve uma redução da CIM do antimicrobiano em aproximadamente 98%. Algumas combinações não obtiveram resultados satisfatórios, possivelmente, por uma incompatibilidade das substâncias. Esses efeitos de redução da concentração inibitória estão descritos na **Tabela 4**. Os resultados sugerem que a combinação de antimicrobianos pode efetivamente inibir o crescimento de micro-organismos multirresistentes, como *S. aureus*.

A combinação de produtos naturais com antimicrobianos possibilitou uma redução na concentração do antimicrobiano e, com isso, diminuição na pressão seletiva frente a isolados resistentes, além da redução da toxicidade do antimicrobiano (MU et al., 2013). As vantagens desta combinação são o aumento do espectro de ação do antimicrobiano, a redução da toxicidade deste, o uso de baixas doses da droga e a prevenção da seleção de bactérias resistentes durante a terapia. Isso permite uma interferência no crescimento da bactéria em diferentes alvos (RIBEIRO et al., 2016).



Entretanto um problema recorrente na combinação de compostos é o pouco conhecimento a respeito do mecanismo de ação das substâncias derivados de produtos naturais (REUK-NGAM et al., 2014).

**Tabela 4.** Percentagem de redução da CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antimicrobiano em sinergismo com as substâncias ( $\beta$ -lapachona e oxima do lapachol ).

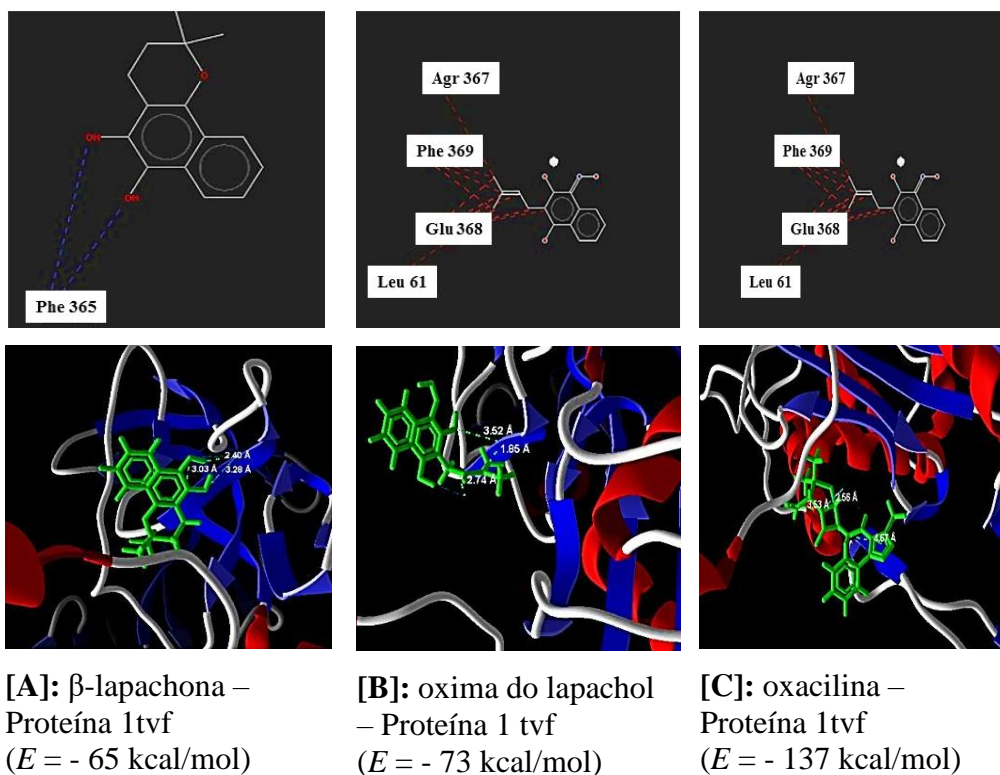
Isolado de <i>S. aureus</i>	Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )								
	CIP	CIP + $\beta$	% de Redução	GE N	GEN + $\beta$	% de Redução	GEN + Oxi	% de Redução	
<b>143</b>	50	1,171	97,65 %	25	-*	-*	-*	-*	-*
<b>242</b>	50	18,75	62,5 %	-*	-*	-*	-*	-*	-*
<b>I9</b>	50	18,75	62,5 %	25	37,5	-*	25	37,5	-*

$\beta$  ( $\beta$ -lapachona ); Oxi (oxima do lapachol ); CIP – ciprofloxacina; GEN – gentamicina.

\*Entende-se por “-”, ausência de atividade.

A compreensão das relações entre os mecanismos de ação permite estabelecer intensidades de efeitos, bem como projetar moléculas para evitar reações adversas. A combinação de drogas pode ao mesmo tempo gerar efeitos sinérgicos, como também trazer desvantagens do ponto de vista farmacocinético e farmacodinâmico. As ferramentas computacionais facilitam a triagem de compostos a fim de encontrar pistas que possam gerar fundamentos a respeito da interação ligante-alvo (VIANA et al. 2018).

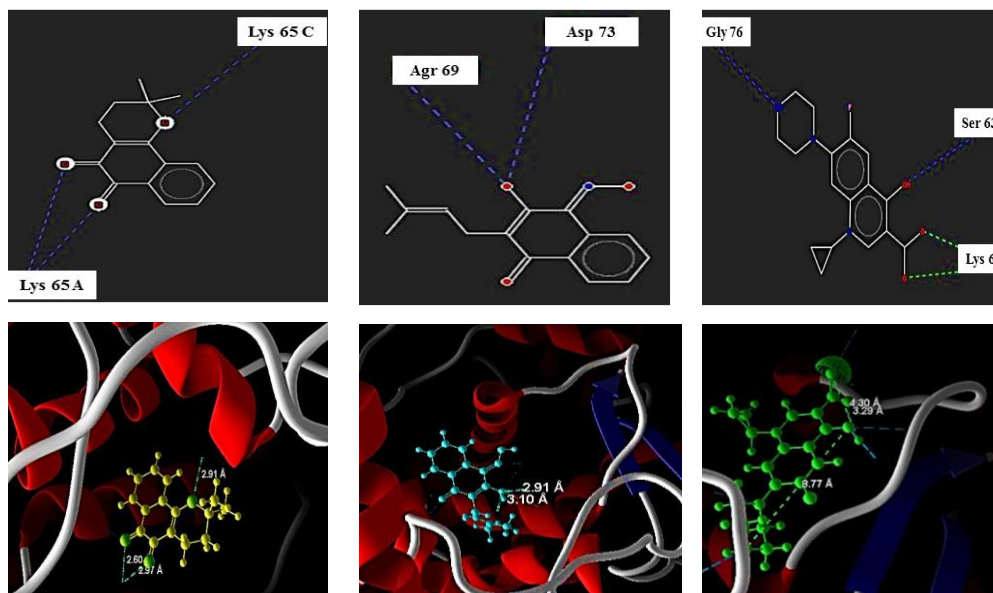
A ferramenta de bioinformática *Molegro Virtual Docker*, versão 6.0.1 (MVD) foi utilizada para verificar a interação entre as substâncias deste estudo. Primeiramente foi realizada a análise de *docking* molecular da  $\beta$ -lapachona, oxima do lapachol e oxacilina em relação à proteína de Ligação as Penicilinas (Proteína 1tvf), alvo do antimicrobiano oxacilina. Observa-se que alguns aminoácidos são comuns na interação, como a fenilalanina (Phe 369) e o glutamato (Glu 368) (Figura 2: Imagens A-B-C). Esse fato pode predizer que os ligantes possuem sítios próximos o que poderia justificar não compatibilidade dos resultados para avaliar o sinergismo entre eles (Figura 2: Imagem D). Além do mais a energia eletrostática da oxacilina é bem maior comparada às moléculas estudadas o que pode favorecer sua interação ao invés das demais, quando combinados.



**Figura 2.** *Docking* molecular das substâncias (oxacilina/  $\beta$ -lapachona/ oxima do lapachol) em estudo com as proteínas tvf. Nas imagens (A-D) estão especificadas a distância de ligação (Å) e a posição dos aminoácidos no sítio ativo da proteína tvf, bem como a energia eletrostática para interação ligante-receptor em kcal/mol).

Na alteração da proteína e o antimicrobiano, foi verificado que as moléculas não apresentam sítios de interação semelhantes ou próximos. No *docking* molecular da  $\beta$ -lapachona, oxima do lapachol e ciprofloxacina em relação a proteína DNA girase (Proteína 5cdr), nota-se que os aminoácidos não se repetem (Figura 3: Imagens E-F-G), ou seja, não existem, possivelmente, sítios de ligação comuns durante o processo de interação intermolecular (Figura 3: Imagens H-I). Isso permite inferir que a combinação

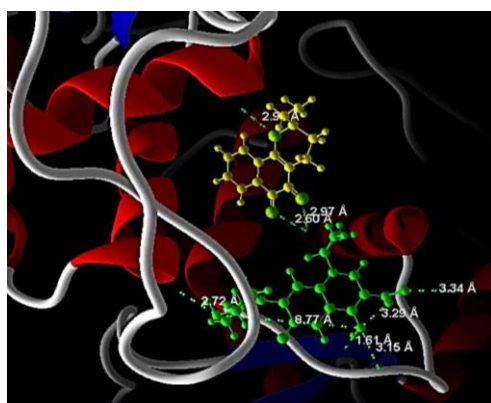
entre esses compostos é favorável (energias eletrostáticas próximas), fato esse mostrado nos resultados obtidos nesse trabalho, principalmente, quando avaliamos o efeito sinérgico da  $\beta$ -lapachona.



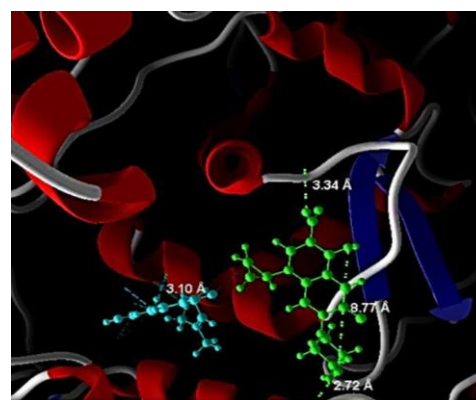
**[E]:**  $\beta$ -lapachona –  
Proteína 5cdr  
( $E = -90$  kcal/mol)

**[F]:** oxima do lapachol  
– Proteína 5cdr  
( $E = -75$  kcal/mol)

**[G]:** ciprofloxacina –  
Proteína 5cdr  
( $E = -95$  kcal/mol)



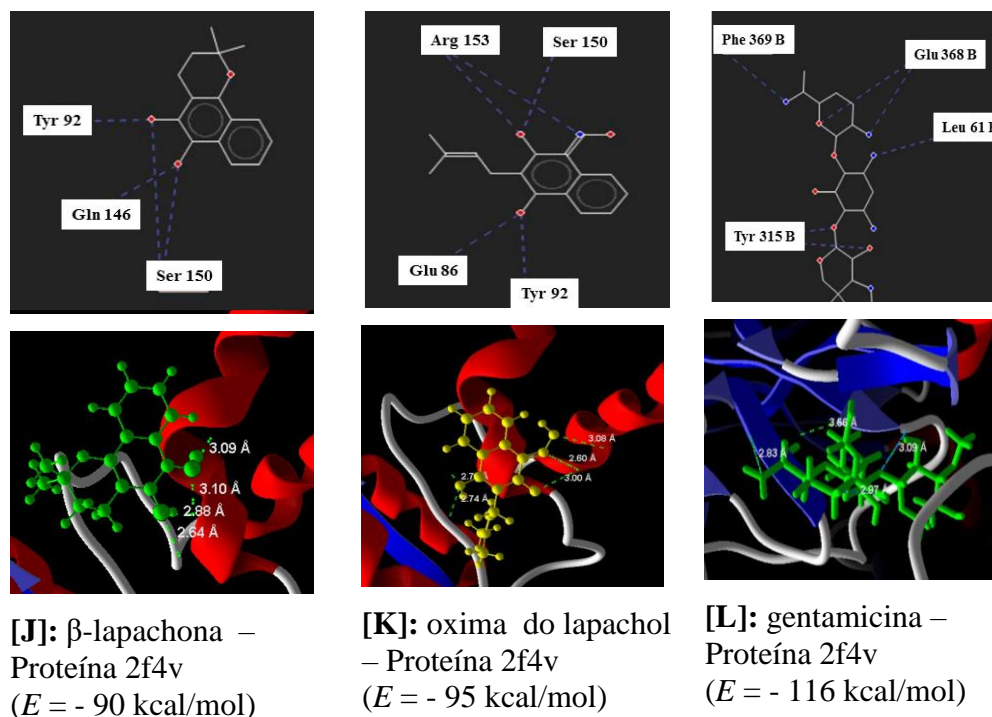
**[H]:**  $\beta$ -lapachona e ciprofloxacina  
interagindo em sítios próximos da  
proteína 5cdr.



**[I]:** oxima do lapachol e  
ciprofloxacina interagindo em sítios  
próximos da proteína 5cdr.

**Figura 3.** *Docking* molecular das substâncias (ciprofloxacina/  $\beta$ -lapachona/ oxima do lapachol) em estudo com as proteínas 5cdr. Nas imagens (E-I) estão especificadas a distância de ligação (Å) e a posição dos aminoácidos no sítio ativo da proteína 5cdr, bem como a energia eletrostática ( $E$ ) para interação ligante-receptor em kcal/mol).

A gentamicina e seu alvo molecular, a subunidade 30S ribossomal (Proteína 2f4v), não houve sítio comum de interação com a  $\beta$ -lapachona, oxima do lapachol (Figura 4: Imagens J-K-L). Mesmo com esse resultado *in silico*, o sinergismo não foi satisfatório, apesar das energias eletrostáticas serem próximas.



**Figura 4.** *Docking* molecular das substâncias (gentamicina/  $\beta$ -lapachona/ oxima do lapachol) em estudo com as proteínas 2f4v. Nas imagens (J-L) estão especificadas a distância de ligação (Å) e a posição dos aminoácidos no sítio ativo da proteína 2f4v, bem como a energia eletrostática ( $E$ ) para interação ligante-receptor em Kcal/mol).

Com base nesses resultados a ferramenta computacional constitui uma medida biotecnológica para estudar a configuração intermolecular de complexos ligante-alvo. A energia atribuída permite ter uma ideia a respeito da afinidade e espontaneidade da interação, predizendo o possível efeito que possa haver. Além do mais o sucesso na otimização do complexo formado facilita a identificação de características farmacocinéticas, perfil de toxicidade e problemas de segurança que possam ocorrer. Na era pós-genômica, *design* de drogas no computador aumentou a gama de aplicações, descoberta de fármacos, alvos, bem como otimização de ensaios pré-clínicos (TRIPATHI et al. 2016).

Considerando o contexto da combinação de substâncias naturais com antimicrobianos, e melhorar a eficácia relativa a atividade antimicrobiana, pode-se

proceder com a formação de micropartículas desses produtos e comparar se existe diferença entre os efeitos. Na **Tabela 5** é que, na maioria dos casos houve redução de 50% na MIC, mas o maior decréscimo foi na combinação tripla entre ciprofloxacina-gentamicina- $\beta$ -lapachona, no qual houve um abatimento de 87,5% em relação a CIM do antimicrobiano da classe das fluorquinolonas.

O uso de compostos bioativos ou puros pode aumentar a eficácia *in vitro* de antimicrobianos utilizados contra uma variedade de micro-organismos, agindo sinergicamente (STEFANOVIC; STANOJEVIC; OMIC, 2012). A terapia sinérgica, dessa forma, constitui uma alternativa significativa para minimizar o problema da resistência antimicrobiana frente a doses usuais dos antimicrobianos. Isso reduz a concentração do antimicrobiano, diminui os efeitos adversos, além de diferentes mecanismos de ação atuando ao mesmo tempo contra o micro-organismo (ALALAIWE et al., 2018).

**Tabela 5.** Atividade sinérgica de micropartículas contendo as substâncias combinadas com os antimicrobianos.

Isolado de <i>Staphylococcus</i> spp.	Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	CIP + $\beta$	Micro CIP + $\beta$	GEN + $\beta$	Micro GEN + $\beta$	Oxi + GEN	Micro Oxi + GEN	Micro CIP – GEN – $\beta$
<b>143</b>	1,171	1,171	-*	-*	-*	-*	-*
<b>242</b>	18,75	9,375	-*	-*	-*	-*	-*
<b>I9</b>	18,75	9,375	37,5	18,75	37,5	18,75	<b>6,25** + 0,78 + 2,34</b>

$\beta$  ( $\beta$ -lapachona); Oxi (oxima do lapachol); CIP – ciprofloxacina; GEN – gentamicina.

\*Entende-se por “-”, ausência de atividade. \*\*Redução de 87,5% em relação a CIM do CIP (50  $\mu\text{g/mL}$ ).

Na medicina humana, esse tipo de tratamento pode reduzir o impacto e a velocidade de disseminação de isolados resistentes. Todavia, devido às considerações relacionadas a saúde pública, muitas escolhas podem suscitar impactos negativos que podem prejudicar o quadro clínico da saúde única (YU et al., 2018).

## Conclusão

Verifica-se, que a  $\beta$ -lapachona e a oxima do lapachol apresentaram atividade antibacteriana. O processo de microencapsulamento permitiu um aumento de aproximadamente 50% na potência relativa das substâncias teste em relação a atividade antimicrobiana. A combinação sinérgica, por sua vez, aumentou em 97% a potência relativa do antimicrobiano ciprofloxacina, possibilitando uma alternativa para controle dos processos que podem levar a expressão de mecanismos de resistência.

## Referencial Bibliográfico

- ABDALLAH, M. et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Arch Clin Microbiol.**, v. 196, n. 7, p. 453-472, 2014.
- AGNIHOTRI, S. A.; SOPPIMATH, K. S.; BETAGERI, G. V. Controlled release application of multilamellar vesicles: a novel drug delivery approach. **Drug Deliv**, v. 17, n. 2, p. 92-101, 2010.
- ALALAIWE, A. et al. Synergistic Anti-MRSA Activity of Cationic Nanostructured Lipid Carriers in Combination With Oxacillin for Cutaneous Application. **Front Microbiol.**, v. 9, n. 1493, p. 1-14, 2018
- ALTIERI, K. T. et al. Eradication of a Mature Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilm From Acrylic Surfaces. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 5, p. 487-491, 2013.
- ARAÚJO, C. R. M. et al. Síntese e Determinação in vitro do FPS-UVB de oxima s Derivadas do Lapachol . **Rev. Virtual de Química**, v. 6, n. 6, p. 1702-1712, 2014.
- ARAÚJO, E. L. et al. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 12, p. 57-59, 2002.
- ASLANTAS, Ö; Demir,C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. **Journal Dairy Science**, v. 99, p. 1-7, 2016.

- ATIQUÉ, T. S. C. et al. Sensibilidade à meticilina/oxacilina de *Staphylococcus aureus* isolados da mucosa nasal de alunos do Centro Universitário de Rio Preto. **Rev. Bras. Farm.** v. 93, n. 3, p. 347-352, 2012.
- Bitrus, A.A., O.M. Peter, M.A. Abbas and M.D. Goni.. *Staphylococcus aureus*: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms. **Veterinary Sciences: Research and Reviews**, v. 4, n. 2, p. 43-54, 2018.
- BHILEGAONKAR S., PARVATKAR A. Eudragit: a versatile and robust platform. **IJPSR**, v. 11, n.6, p:2626-2635, 2020.
- CHUKWUNONSO E. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Mini Review. **Int J Med Res Health Sci**, v. 7, n. 1, p. 122-127, 2018.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility**. Approved standard M27-A3, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2014.
- CRAGG G. M. e Newman D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1830, p. 3670–3695, 2013.
- FERNANDES A. W. C et al. Anti-biofilm Effect of  $\beta$ -Lapachone and Lapachol Oxime Against Isolates of *Staphylococcus aureus*. **Current Microbiology**, v. 77, p. 204–209, 2020.
- LEE Y. S.; JANG, K. A.; CHA, J. D. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. **J Biomed Biotechnol.**, p. 1-7, 2012.
- MU S. –H. et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytomedicine**, v.20, p.714-8, 2013.
- Nikam V. K. et al. Eudragit a Versatile Polymer: a Review. **Pharmacologyonline.**, v. 1, p. 152-164, 2011.
- OLIVEIRA M. E. F A. G. et al. Evaluation of acute toxicity of  $\beta$ -lapachone associated with chitosan as a cytoprotective agent. **J Bras Patol Med Lab**, v.54, n.5, p.279-287, 2018.

- REUK-NGAM N. et al. Antimicrobial Activity of Coronarin D and Its Synergistic Potential with Antibiotics. **BioMed Research International**, v. 2014. Doi:| <https://doi.org/10.1155/2014/581985> , 2014.
- RIBEIRO S. M. et al. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 160, p. 133–144, 2016.
- SANTOS, T. M. M. **Preparação e caracterização de partículas de Eudragit® L100 contendo nifedipino e comparação de parâmetros cinéticos com cápsulas comerciais de nifedipino.** Dissertação (Pós-Graduação em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Juazeiro - BA, Juazeiro - BA, 2013.
- STEFANOVIC, O. D.; Stanojevic, D. D; Omiđc, L. R. Synergistic antibacterial activity of salvia officinalis and cichorium intybus extracts and antibiotics. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**, v. 69, n. 3, p. 457-463, 2012.
- TACCONELLI E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infect Dis**, v. 18, p. 318–27, 2018.
- TAYLOR P. W. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial. **International Journal of Antibacterial Agents**. v. 42, p. 195-201, 2013.
- UPADHYAY, A. et al. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. **BioMed Research International**, v. 2014. Doi: <https://doi.org/10.1155/2014/761741> , 2014.
- Varisco, M. et al. New antimicrobial and biocompatible implant coating with synergic silver–vancomycin conjugate action. **Chemistry Enabling Drug Discovery**, v. 9. n. 6. p. 1221-1230, 2014.
- VIANA J. O. et al. Drug discovery and computational strategies in the multitarget drugs era. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 54(Special), p. 1-25, 2018.
- TRIPATHI R. B. et al. In-silico expectations of pharmaceutical industry to design of new drug molecules. **JIPBS**, p. 95-103, 2016.



YU, Y. et al. Combination therapy strategies against multiple-resistant *Streptococcus* Suis. **Frontiers in Phar**, v. 9, p. 1-10, 2018.

## 8. CONCLUSÃO

A pesquisa com produtos naturais é uma alternativa promissora para o tratamento de micro-organismos multirresistentes no contexto da *One Health*. A  $\beta$ -lapachona e a oxima do lapachol apresentaram atividade antibacteriana e efeito sinérgico com os antimicrobianos analisados, bem como uma alternativa para pesquisa e desenvolvimento de substâncias que interferem com mecanismos de resistência, como a bomba de efluxo. O processo de microencapsulamento, dessa forma, permitiu uma redução de aproximadamente 50% na potência das substâncias. A combinação sinérgica, por sua vez, reduziu em 97% a potência do antimicrobiano ciprofloxacina possibilitando uma alternativa para controle dos processos que levam a multirresistência.

**REFERÊNCIAS**

- AGNIHOTRI, S. A.; SOPPIMATH, K. S.; BETAGERI, G. V. Controlled release application of multilamellar vesicles: a novel drug delivery approach. **Drug Deliv**, v. 17, n. 2, p. 92-101, 2010.
- AKINDOLIRE M. A. et al. Detection of Antibiotic Resistant *Staphylococcus aureus* from Milk: A Public Health Implication. **Int. J. Environ. Res. Public Health**., v. 12, p. 10254-10275, 2015.
- ALGAMMAL A. M. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. **Infection and Drug Resistance**, v.13, p:3255-3265, 2020.
- ALTIERI, K. T. et al. Eradication of a Mature Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilm From Acrylic Surfaces. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 5, p. 487-491, 2013.
- ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; NETO, P. J. R. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, supl., p. 57-59, 2002.
- ARAÚJO, C. R. M. et al. Síntese e Determinação in vitro do FPS-UVB de oximas Derivadas do Lapachol. **Rev. Virtual de Química**, v. 6, n. 6, p. 1702-1712, 2014.
- ARCHER, N. K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms. **Virulence** v. 2, n. 5, p. 445-459, 2011.
- ARCIOLA, C. R. et al. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 1-7, 2015.
- ARUGUETE, D. M. et al. Antimicrobial nanotechnology: its potential for the effective management of microbial drug resistance and implications for research needs in microbial nanotoxicology. **Environ. Sci.: Processes Impacts**, v. 15, p. 93–102, 2013.

- ATIQUÉ, T. S. C. et al. Sensibilidade à meticilina/oxacilina de *Staphylococcus aureus* isolados da mucosa nasal de alunos do Centro Universitário de Rio Preto. **Rev. Bras. Farm.** v. 93, n. 3, p. 347-352, 2012.
- BARREIRO E. J., BOLZANI V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p.679-688, 2009.
- BAYM M., STONE L. K., KISHONY R. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. **Science.**, v. 351, p. 3292-1-8, 2016.
- BÜTTNER, H. et al. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.5, p.1-15, 2015.
- BHILEGAONKAR S., PARVATKAR A. Eudragit: a versatile and robust platform. **IJPSR**, v. 11, n.6, p:2626-2635, 2020.
- CAMPERIO, C. et al. Mouse mastitis model to study the effects of the intramammary infusion of a food-grade *Lactococcus lactis* strain. **Plos one**, 2017.
- COS P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290–302, 2006.
- COSTA-LOTUFO L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.** v. 2, n. 1, p.47-58, 2010.
- CRAGG G. M., NEWMAN D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1830, p. 3670–3695, 2013.
- DETSI A. Nanosystems for the Encapsulation of Natural Products: The Case of Chitosan Biopolymer as a Matrix. **Pharmaceutics**, v. 12, n.669, p. 2-48, 2020.
- DHANASHEKAR R. et al. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. **GERMS.**, v. 2, n. 3, p. 101-109, 2012.

- FERREIRA S. B. et al.  $\beta$ -Lapachona: Sua Importância em Química Medicinal e Modificações Estruturais. **Rev. Virtual Quim.**, v. 2, n.2, p. 140-160, 2010.
- GOMES, F.; SAAVEDRA, M. J.; HENRIQUES, M. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. **PATHOG DIS.**, v. 74, n. 3, 2016.
- GONZALES P. R. synergistic, collaterally sensitive  $\beta$ -lactam combinations suppress resistance in MRSA. **Nature Chemical Biology.**, v. 11, p. 855-865, 2015.
- KAMUGAI, Y. The chemical biology of naphtho-quinones and its environmental implications. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v.52, p.221–247, 2012.
- LAMMINE S. L. e HUGHES J. M. Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.**, v.7, p.287–312, 2016.
- LEONCIO J. M. Impacto das infecções relacionadas à assistência à saúde nos custos da hospitalização de crianças\*. **Rev Esc Enferm USP**, v. 53, p. 03486, 2019.
- LETCHFORD, K.; BURT, H. “A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes”. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 65, n. 3, p. 259-69, 2007.
- LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluation dose-effect experiments. **J. of Pharmac. Exp. Ther.**, v. 96, p. 99-113, 1949.
- LÓPEZ, D; VLAMAKIS, H; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 2, n. 7, p. 1-11, 2010.
- MILLER J. M. Implications of the One Health Paradigm for Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Newsletter.**, v. 32, p. 51-57, 2010.
- MIMICA M. J. Atualização sobre detecção laboratorial de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med.** v. 57, p. 129-34, 2012.



- MUNCK C et al. Prediction of resistance development against drug combinations by collateral responses to component drugs. **Sci Transl Med.**, v. 12, n. 6, p.156-262, 2014.
- NIKAM V. K. et al. Eudragit a Versatile Polymer: a Review. **Pharmacologyonline.**, v.1, p.152-164, 2011.
- PAHARIK, A. E. e HORSWILL A. R. Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response. **Microbiol Spectr.** v. 4, n. 2, p. 529-566, 2016.
- PÁL C., PAPP B., LÁZÁR, V. Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. **Trends in Microbiology.**, Dóí: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.009>, p. 1-7, 2015.
- PARK J-H et al. Extracellular protease in *Actinomycetes* culture supernatants inhibits and detaches *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Biotechnol Lett**, v. 34, p.655–661, 2012.
- RIBEIRO S. M. et al. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 160, p. 133–144, 2016.
- SEIL, J. T., WEBSTER, T. J. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature . **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2767–2781, 2012.
- SONJE A., CHANDRA A. Comprehensive Review on Eudragit polymers. **Res. J. Pharm.**, v. 4, n. 5, p. 71-75, 2013.
- STEFANOVIC, O. D.; STANOJEVIC, D. D; OMIAC, L. R. Synergistic antibacterial activity of salvia officinalis and cichorium intybus extracts and antibiotics. **Acta Poloniae Pharmaceutica n Drug Research**, v. 69, n. 3, p. 457-463, 2012.
- TAYLOR P. W. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial. **International Journal of Antibacterial Agents**. v. 42, p. 195-201, 2013.
- UPADHYAY, A. et al. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. **BioMed Research International**, v.2014. Doi: <https://doi.org/10.1155/2014/761741> , 2014.


VERDEROSA A. D., TOTSIKA M.e FAIRFULL-SMITH, K. Bacterial Biofilm  
Eradication Agents: A Current Review. **Front. Chem.**, v. 7, p. 1-17, 2019.

## ANEXOS

### Capítulo 2 – “*The use of the Checkerboard Method to select anti-microbial compounds*”.

**Revista:** *Journal of Microbiological Methods* (Qualis A4).

Confirming submission to Journal of Microbiological Methods - [EMID:f16cefd23e02a3c9]   Caixa de entrada x

 **Journal of Microbiological Methods** <em@editorialmanager.com> 13:04 (há 0 minuto) ☆ ↶ ⋮  
 para mim ▾

\*This is an automated message.\*

The use of the Checkerboard Method to select anti-microbial compounds

Dear Professor Wilton Cavalcante Fernandes,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Journal of Microbiological Methods.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/mimet/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,  
Journal of Microbiological Methods

More information and support



You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>





**Capítulo 3** –  *$\beta$ -lapachone and lapachol Oxima on phenotypic resistance interference by efflux pump in Staphylococcus aureus*


**Revista:** *Biochemical Pharmacology (Qualis A1)*

---

Submission Confirmation for  $\beta$ -lapachone and lapachol Oxima on phenotypic resistance interference by efflux pump in Staphylococcus aureus   Caixa de entrada x

 **Biochemical Pharmacology** <em@editorialmanager.com>  
 para mim ▾

11:10 (há 0 minuto) ☆ ↶ ⋮

 inglês ▾ > português ▾ [Traduzir mensagem](#)

[Desativar para: inglês](#) x

Dear Dr. Wilton Cavalcante Fernandes,

This is to confirm your manuscript files have been submitted to the editorial office via the on-line system. You will receive further correspondence within the next few days.

Thank you for choosing Biochemical Pharmacology.

Kind regards,

Lynn LeCount  
Managing Editor  
Biochemical Pharmacology Editorial Office

\*\*\*\*\*

**Capítulo 4** – *Synergistic effect, silica design and nanoencapsulation of  $\beta$ -lapachone, Lapachol oxime in the suppression of resistance in MRSA*

**Revista:** *Microbiological Research (Qualis B1/ Fator de impacto: 3,97)*

