



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

Hanne Lazla Rafael de Queiroz Macêdo

**ATIVIDADE DA BETA-LAPACHONA ASSOCIADA A ANTIMICROBIANOS SOBRE  
CEPAS DO COMPLEXO *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* MULTIDROGA  
RESISTENTES**

Recife

2022

HANNE LAZLA RAFAEL DE QUEIROZ MACÊDO

**ATIVIDADE DA BETA-LAPACHONA ASSOCIADA A ANTIMICROBIANOS  
SOBRE CEPAS DO COMPLEXO *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*  
MULTIDROGA RESISTENTES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Coordenação do curso de Bacharelado em Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco  
- UFPE, como requisito parcial à obtenção do título  
em Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientadora:** Prof.º Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Recife

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Macêdo, Hanne Lazla Rafael de Queiroz.

Atividade da beta-lapachona associada a antimicrobianos sobre cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* multidroga resistentes / Hanne Lazla Rafael de Queiroz Macêdo. - Recife, 2022.

57 : il., tab.

Orientador(a): Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2022.

1. Microbiologia médica. 2. Antimicrobianos. 3. Complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. 4. Sinergismo. 5. Beta-lapachona. I. Ximenes, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

HANNE LAZLA RAFAEL DE QUEIROZ MACÊDO

**Atividade da beta-lapachona associada a antimicrobianos sobre cepas do complexo  
*Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* multidroga resistentes**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, como um dos requisitos exigidos para obtenção do título em Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Prof.ª Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

Data de aprovação: 07/10/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.ª Dr.ª. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Raíssa Ximenes Lima MSD

Universidade Federal de Pernambuco

---

Renan Andrade Fernandes de Souza MSD

Universidade Federal de Pernambuco

## AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, pela dádiva da vida, por me guiar por qual caminho devo seguir e me preencher com fé e perseverança para que eu possa enfrentar todos os obstáculos com êxito na caminhada.

A minha orientadora **Profª Drª Eulália Ximenes**, pelos ensinamentos acadêmicos e por se tornar mais que uma orientadora, uma grande amiga. Minha imensurável gratidão por todo conselho dado, pela confiança, companheirismo de sempre e pelas suas palavras de força, esperança e fé, na constante batalha do dia a dia.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de micro-organismo (LFBM) do Deptº de Antibióticos da UFPE, que tornaram essa caminhada mais leve, **Luciana, Renan, Gleyci, Lícia, Amanda e Eduardo**. Em especial, ao meu amigo **Willyam Régio**, por toda ajuda e companheirismo para realização dos nossos experimentos.

A minha mãe **Patrícia**, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Ao meu pai **Eugênio** por todo amor, exemplo e apoio incondicional. Aos meus irmãos, **Cauã e Lucas**, pela motivação diária e força que vocês representam na minha vida. A minha tia, **Veridiana**, por toda força desde o início dessa caminhada. Ao meu companheiro, **Aghamenan**, por todo amor, compreensão e ajuda emocional para que eu conseguisse vencer essa batalha. Sem vocês por perto, tudo seria bem mais difícil.

Ao meu amigo, **Ademilton** por ser um irmão, incentivador e porto seguro. A minha grande amiga e companheira de todas os momentos, **Ana Pietra**, por todas as palavras de força e conselhos. A minha amiga **Hayane Cândido**, que desde o ensino médio vem sendo uma irmã para minha vida. Aos meus amigos que tornaram essa etapa mais leve e divertida, em especial a **Matheus Leonydas, Ana Carla, Daniel Pereira, José Lauriano, Lucas Manguinho e Carolina Targino**.

A toda equipe do Projeto de Extensão Adote um Vira-Lata, em especial a **Ariene Guimarães, Rayane Medeiros e Brenda Estefany** por todo amor, carinho e ajuda nessa caminhada.

## RESUMO

Apesar dos avanços na biologia e medicina, o mundo assiste ao aumento das doenças infecciosas. A utilização indiscriminada de antimicrobianos associada ao crescente isolamento de cepas resistentes é hoje uma realidade. A multirresistência bacteriana e sua relação com a morbidade/mortalidade de pacientes internados tem preocupado os órgãos responsáveis pela vigilância epidemiologia das infecções nosocomiais. Nesse contexto, esse estudo objetivou avaliar a Concentração Inibitória Mínima da beta-lapachona frente a nove cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (LFBM 03, LFBM 04, LFBM 05, LFBM 08, LFBM 20, LFBM 22, LFBM 23, LFBM 25, LFBM 26) e uma cepa padrão (ATCC 19606) obtida do American Type Culture Collection. Os valores de Concentração Inibitória Mínima da beta-lapachona variaram de 1024 a 512 µg/mL. A segunda etapa do trabalho consistiu em avaliar a associação da beta-lapachona com oito antibióticos (amicacina, ciprofloxacino, cloridrato de cefepime, gentamicina, imipenem, rifampicina, tigeciclina e vancomicina) pelo método Overlay Inoculum Susceptibility Disc. A amicacina e cloridrato de cefepime foram os antimicrobianos que mais apresentaram efeito sinérgico na associação com a beta-lapachona frente a cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. A associação beta-lapachona-vancomicina foi sinérgica para as cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* LFBM 05, LFBM 25 e LFBM 26. A associação beta-lapachona com o imipenem, mostrou-se indiferente frente a todas as cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* avaliadas nesse estudo. Este estudo demonstrou que a beta-lapachona combinada com os antimicrobianos: amicacina, cloridrato de cefepime e vancomicina, agem sinergicamente, inibindo cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

**Palavras-chave:** Beta-lapachona; Complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* multidroga resistentes; Concentração Inibitória Mínima (CIM); Sinergismo;

## ABSTRACT

Despite advances in biology and medicine, the world is witnessing an increase in infectious diseases. The indiscriminate use of antimicrobials associated with the growing isolation of resistant mutants is now a reality. Bacterial multidrug resistance and its relationship with morbidity/mortality of hospitalized patients has concerned the bodies responsible for the epidemiological surveillance of nosocomial infections. In this context, this study aimed to evaluate the Minimum Inhibitory Concentration beta-lapachone against nine strains of the *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* complex (LFBM 03, LFBM 04, LFBM 05, LFBM 08, LFBM 20, LFBM 22, LFBM 23, LFBM 25, LFBM 26) and a standard strain (ATCC 19606) obtained from the American Type Culture Collection. The Minimum Inhibitory Concentration values of beta-lapachone ranged from 1024 to 512 µg/mL. The second stage of the work consisted of evaluating the association of beta-lapachone with eight antibiotics (amikacin, ciprofloxacin, cefepime hydrochloride, gentamicin, imipenem, rifampicin, tigecycline and vancomycin) using the Overlay Inoculum Susceptibility Disc method. Amikacin and cefepime hydrochloride were the antimicrobials that most showed a synergistic effect in association with beta-lapachone against strains of the *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* complex. The beta-lapachone-vancomycin association was synergistic for the strains of the *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* complex LFBM 05, LFBM 25 and LFBM 26. This study demonstrated that beta-lapachone combined with the antimicrobials: amikacin, cefepime hydrochloride and vancomycin, act synergistically, inhibiting strains of the *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* complex.

**Keywords:** Beta-lapachone; multi drug resistant *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* complex; Minimum Inhibitory Concentration (MIC); synergism;

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Cepa do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* visualizada por microscopia ótica (1000x), após coloração de Gram.

**Figura 2.** Cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* em meio Ágar Triplo Açúcar de Ferro (TSI Agar). Reação alcalino-alcino, característica de microrganismos não fermentadores.

**Figura 3.** Utilização do Citrato de sódio (ágar Citrato de Simmons ). Teste positivo para cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

**Figura 4.** Método Checkerboard.

**Figura 5.** ETEST.

**Figura 6.** Representação do Método Overlay Inoculum Susceptibility Disc.

**Figura 7.** Formas isoméricas da naftoquinona.

**Figura 8.** *Tabebuia avellanadae*.

**Figura 9.** Estrutura química da beta-lapachona.

**Figura 10.** Padronização do inóculo do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

**Figura 11.** Filtração da solução de beta-lapachona.

**Figura 12.** Método Overlay Inoculum Susceptibility Disc para determinação do sinergismo entre beta-lapachona e antimicrobianos.

**Figura 13.** Determinação da Concentração Inibitória Mínima da beta-lapachona frente as cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* LFBM 26; LFBM 03, LFBM 04, LFBM 05, LFBM 08, LFBM 20, LFBM 22, LFBM 23.

**Figura 14.** Percentual de aumento do Diâmetro da Zona de Inibição da associação beta-lapachona com oito antimicrobianos (Amicacina, ciprofloxacino, cloridrato de cefepime, gentamicina, imipenem, rifampicina, tigeciclina e vancomicina) frente a *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* LFBM 03; LFBM 04, LFBM 05; LFBM 08.

**Figura 15.** Percentual de aumento do Diâmetro da Zona de Inibição da associação beta-lapachona com oito antimicrobianos (amicacina, ciprofloxacino, cloridrato de cefepime, gentamicina, imipenem, rifampicina, tigeciclina e vancomicina) frente a *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* LFBM 03; LFBM 04, LFBM 05; LFBM 08.

**Figura 16:** Sinergismo representado na cepa LFBM 05 da associação beta-lapachona com amicacina.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Origem do Isolamento e fenótipo de resistência de dez cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima da beta-lapachona e de antimicrobianos convencionais frente a cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*

**Tabela 3.** Associação entre beta-lapachona e antimicrobianos frente a cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* utilizando o método Overlay InoculumSusceptibility Disc.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AMP** – Ampicilina;

**AMI** – Amicacina;

**CIP** – Ciprofloxacina;

**CBM** – Concentração Bactericida Mínima

**CIM** – Concentração Inibitória Mínima

**CLSI** – Clinical Laboratory Standard Institute

**CPM** – Cloridrato de Cefepime

**COL** – Colistina;

**DP** – Desvio padrão;

**DZI** – Diâmetro da Zona de Inibição;

**EPM** – Erro padrão da média;

**GEN** – Gentamicina;

**MDR** – Multidroga resistente;

**MER** – Meropenem;

**MHB** – Mueller-Hinton;

**mL** – Mililitro

**SMX-TMP** – Sulfametoxazol/Trimetoprim;

**IPM** – Imipenem;

**LEV** – Levofloxacina;

**R** – Resistente;

**ROS** – espécies reativas de oxigênio;

**VAN** – Vancomicina;

**LFBM** – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos.

**µg** – Micrograma

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
2.1	OBJETIVOS	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>14</b>
3.1	GÊNERO ACINETOBACTER	14
<b>3.1.1</b>	<b>Aspectos gerais</b>	<b>14</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Metabolismo, características bioquímicas e morfológicas</b>	<b>14</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Mecanismos de resistência</b>	<b>16</b>
3.2	MÉTODOS PARA O ESTUDO DE ASSOCIAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS	18
<b>3.2.1</b>	<b><i>Overlay Inoculum Susceptibility Disc</i></b>	<b>20</b>
3.3	TRATAMENTO	20
<b>3.3.1</b>	<b>Naftoquinonas</b>	<b>21</b>
3.3.1.1	Beta-lapachona	23
<b>3.3.2</b>	<b>Amicacina</b>	<b>25</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Ciprofloxacino</b>	<b>25</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Cloridrato de Cefepime</b>	<b>25</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Polimixinas</b>	<b>26</b>
3.3.5.1	Colistina	26
3.3.5.2	Polimixina B	26
<b>3.3.6</b>	<b>Gentamicina</b>	<b>26</b>
<b>3.3.7</b>	<b>Imipenem</b>	<b>27</b>
<b>3.3.8</b>	<b>Rifampicina</b>	<b>27</b>
<b>3.3.9</b>	<b>Tigeciclina</b>	<b>27</b>
<b>3.3.10</b>	<b>Vancomicina</b>	<b>27</b>
<b>3.3.11</b>	<b>Sufamentaxol-Trimetopril</b>	<b>28</b>
<b>3.3.12</b>	<b>Levofloxacino</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
4.1	MICROORGANISMOS E PREPARAÇÃO DO INÓCULO	29
4.2	AGENTES ANTIMICROBIANOS	31
4.3	PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BETA-LAPACHONA	31

4.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	31
4.5	ASSOCIAÇÃO DA BETA-LAPÁCHONA COM ANTIBIÓTICOS CONVENCIONAIS	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
5.1	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA BETA-LAPACHONA	34
5.2	ASSOCIAÇÃO BETA-LAPACHONA-ANTIMICROBIANOS	34
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* engloba espécies oportunistas predominantemente associado às infecções nosocomiais (RAMIREZ *et al.*, 2020). As infecções causadas pela espécie *Acinetobacter baumannii* representam cerca de 2% de todas as infecções associadas à assistência médica. Embora as taxas de infecção sejam baixas em comparação a outros patógenos Gram-negativos (figura 1), cerca de 45% de todos os isolados são considerados resistentes a múltiplas drogas (MDR) (VÉZQUEZ *et al.*, 2020).

Publicações da Organização Mundial da Saúde sobre "patógenos prioritários" resistentes a antibióticos incluem o complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* resistentes aos carbapenêmicos como um dos microrganismos patogênicos mais importante em saúde pública (OMS, 2017). Desta forma, o último recurso terapêutico para essas infecções são as polimixinas (THOMAS *et al.*, 2019).

O complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* desenvolve inúmeras estratégias para resistir a ação dos antimicrobianos que incluem: a biossíntese de enzimas inativadoras, alterações nas proteínas de ligação à penicilina e bombas de efluxo. Além disso, recentemente foram isoladas cepas de *A. baumannii* resistentes às associações ceftazidima-avibactam, piperacilina-tazobactam e ampicilina-sulbactam, reduzindo ainda mais as possibilidades terapêuticas (THOMAS *et al.*, 2019).

Diante deste fato, a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos bem como novas abordagens terapêuticas são necessárias. Neste cenário, surgem as naftoquinonas, metabólitos secundários de microrganismos, algas e plantas superiores com inúmeras propriedades farmacológicas (TAHARA *et al.*, 2020; WELLINGTON *et al.*, 2020). Associações entre metabólitos secundários e antimicrobianos tem sido uma alternativa para melhorar a eficácia desses últimos e são uma opção para tratar infecções causadas por microrganismos resistentes a vários fármacos, especialmente ao complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* multidroga resistentes para os quais, a terapia é limitada (NASR *et al.*, 2020)

Nesse contexto, surge a beta-lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona), uma naftoquinona que tem sido nas últimas décadas muito pesquisado por diversos grupos de cientistas. A beta-lapachona é extraída da casca de várias plantas brasileiras a exemplo do lapacho (*Tabebuia avellanedae*) ou sintetizados a partir do lapachol ou lomatiol que são conhecidos por possuir uma variedade de propriedades farmacológicas,

incluindo atividades antitumorais (SANTANA *et al.*, 1968), anti-inflamatórias (ALMEIDA *et al.*, 1990), antiprotozoária (TEIXEIRA *et al.*, 2001) e antimicrobianas (SILVA *et al.*, 2003).

Até o momento não se tem notícias de publicações acerca da atividade antimicrobiana de beta-lapachona sobre o complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. Neste sentido, surge a necessidade de avaliar atividade anti-acinetobacter da beta-lapachona, bem como associações com antibióticos usuais pela técnica *Overlay Inoculum Susceptibility Disc*. Esse método é considerado misto, pois necessita previamente da Concentração Inibitória Mínima e, apesar de ser uma técnica qualitativa, ela fornece condições de fazer uma triagem com maior número de moléculas no laboratório e a partir desse resultado podemos direcioná-los para utilizar métodos como o checkerboard ou time kill.

Diante desse fato, o presente estudo teve como objetivo, numa primeira etapa, determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da beta-lapachona, bem como de drogas comerciais (amicacina, ciprofloxacino, colistina, gentamicina, imipenem, meropenem, levofloxacino, polimixina B e sulfametoxazol-trimetoprima). Avaliar o potencial sinérgico das associações beta-lapachona e agentes antimicrobianos que são usualmente utilizados no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, tais como: amicacina, ciprofloxacino, cloridrato de cefepime, gentamicina, imipenem, rifampicina, tigeciclina e vancomicina pelo método *Overlay Inoculum Susceptibility Disc*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana da beta-lapachona e de suas associações com antimicrobianos frente a cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* multidroga-resistentes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da beta-lapachona, frente a cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*;
- Associar a beta-lapachona em concentrações subinibidoras (1/20 x CIM) à discos antimicrobianos de vancomicina, imipenem, ciprofloxacino, amicacina, gentamicina, rifamicina, tigeciclina e cloridrato de cefepina;
- Determinar o tipo de interação causada pelas associações sobre cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 GÊNERO *ACINETOBACTER*

##### 3.1.1 Aspectos gerais

O gênero *Acinetobacter* foi descrito em 1954 por Brisou e Prévot (BRISOU *et al* 1954). De acordo com a literatura, os microrganismos do gênero *Acinetobacter* são pertencentes a família Moraxellaceae que compreendem bactérias que ocorrem no solo e em águas (ROSSAU *et al.*, 1991). Entretanto, apesar de pertencer a uma família que predominantemente são de vida livre, esse gênero engloba espécies oportunistas causadoras de infecções em humanos, ou seja, ao encontrar uma lacuna no sistema imunológico causam infecções predominantemente nosocomiais.

As infecções causadas pela espécie *baumannii* representam cerca de 2% de todas as infecções associadas à assistência médica, atingindo principalmente pacientes imunocomprometidos. Embora as taxas de infecção sejam baixas em comparação a outros patógenos Gram-negativos, cerca de 45% de todos os isolados são considerados resistentes a múltiplas drogas (MDR) (RAMIREZ *et al*, 2020). Cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* vem sendo reportadas como agente causador de meningite, septicemia, infecções em feridas de queimados, no trato respiratório, urinário e ósseas (MORRIS *et al*, 2019).

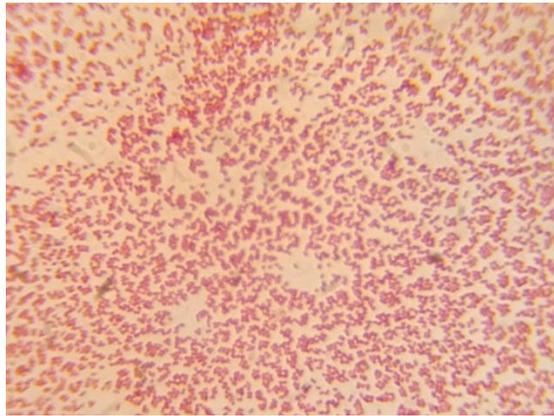
Esse sucesso clínico deve-se ao fato de possuir inúmeras estratégias para colonizar diversos sistemas do corpo humano devido a sua plasticidade genômica e sua intrínseca característica de apresentar resistência a vários antimicrobianos (SAHL *et al*, 2011; CLARK *et al.*, 2016).

##### 3.1.2 Metabolismo, características bioquímicas e morfológicas

O complexo *Acinetobacter baumannii* é morfológicamente definido como cocobacilo, e pela coloração de Gram apresentam-se como Gram-negativo (figura 1), com ausência de mobilidade, catalase negativo, oxidase-negativa, não fermentador (figura 2), citrato positivo (figura 3), não forma esporos, não fixam nitrogênio e não são capazes de desenvolver pigmentos como produto do seu metabolismo. É um microrganismo considerado cosmopolita, isto é, foi isolado de inúmeros locais, incluindo solos e locais aquáticos, fator este que contribui para a infecção de pacientes hospitalizados, visto que, a sua maior forma de contágio é através do contato físico entre profissionais da saúde e pacientes. Além disso,

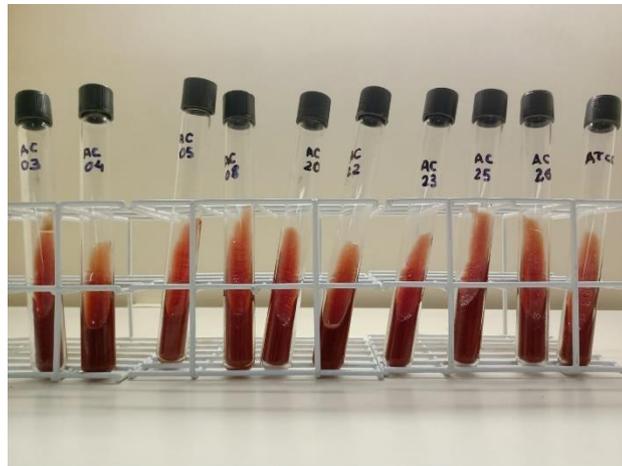
essa espécie possui uma característica de sobreviver por cerca de trinta dias em superfícies com ausência de umidade, aumentando assim os riscos de colonização em pacientes imunocomprometidos (WONG *et al*, 2017).

Figura 1: Cepa do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* visualizada por microscopia ótica (1000x), após coloração de Gram.



Fonte: A autora (2022)

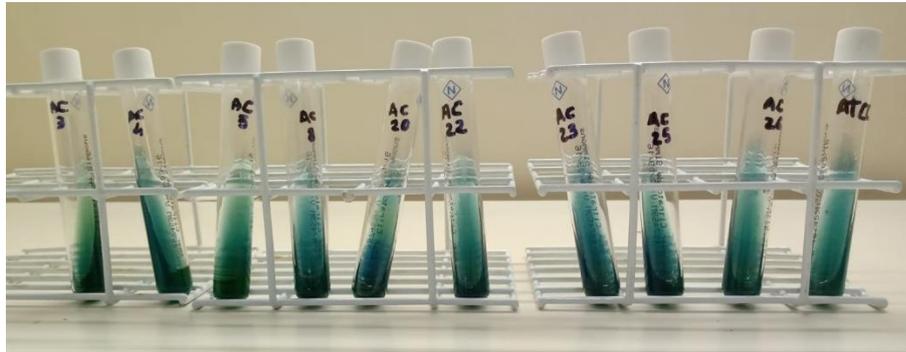
Figura 2: Cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* em meio Ágar Triplo Açúcar de Ferro (TSI Agar). Reação alcalino-alcalino, característica de microrganismos não fermentadores.



Fonte: A autora (2022)

Uma característica marcante dessa espécie é a formação de um biofilme espesso e firme, fator que dificulta seu tratamento. De modo que, o biofilme atua como uma espécie de barreira protetora e propicia o aumento da resistência à inúmeros fármacos (YANG *et al.*, 2019).

Figura 3: Utilização do Citrato de sódio (ágar Citrato de Simmons). Teste positivo para cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*



Fonte: A autora (2022)

### 3.1.3 Mecanismos de resistência

A preocupação com o surgimento de cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* com resistência a antimicrobianos permeia desde 1980. Um microrganismo é considerado resistente quando os mesmos não respondem mais ao tratamento por fármacos, causado por mecanismos de resistência. Esses microrganismos resistentes trazem como consequência para o paciente um tratamento mais complicado que, conseqüentemente, o debilita mais elevando o índice de mortalidade, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (VELOSO *et al.*, 2019). Um grande problema atual é a automedicação e, conseqüentemente, a utilização incorreta de antibióticos, que tem colaborado para o surgimento de microrganismos resistentes, gerando um problema de saúde pública, onde muitos países são afetados (OMS, 2020).

A Organização Mundial da Saúde incluiu em 2017, na primeira colocação da lista de patógenos prioritários, o complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* resistente aos carbapenêmicos incluindo-o assim, como um dos microrganismos que devem ter principal atenção para os pesquisadores (GIAMMANCO *et al.*, 2018; OMS, 2020). Desta forma, o último recurso terapêutico para essas infecções são as polimixinas, tigeciclina, aminoglicosídeos e suas associações (THOMAS *et al.*, 2019).

O complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* é conhecido por possuir uma vasta predisposição para desenvolver inúmeras estratégias para bloquear as ações terapêuticas dos antimicrobianos. Esses microrganismos são conhecidos por possuírem uma alta plasticidade genômica e adquirem genes de resistências através de macromoléculas móveis compostas de DNA, tais como: íntegrans, plasmídeos, sequências de inserção, ilhas

de resistência e transposons (LYNCH *et al.*, 2017). São inúmeros mecanismos de resistências do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*, esses incluem: (1) biossíntese de enzimas inativadoras ou modificação dos antimicrobianos; (2) alterações nas porinas (que dificultam a entrada de beta-lactâmicos no espaço periplasmático da bactéria); (3) aumento da expressão de bombas de efluxo (levando a diminuição da concentração de antimicrobianos no interior da célula); (4) alteração em sítios alvos dos antimicrobianos (LEE *et al.*, 2017; LYNCH *et al.*, 2017).

Além disso, recentemente foram isoladas cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes às associações ceftazidima-avibactam, piperacilina-tazobactam e ampicilina-sulbactam, reduzindo ainda mais as possibilidades terapêuticas (THOMAS *et al.*, 2019). O mecanismo de resistência pela produção de beta-lactamases é um dos principais mecanismos desenvolvidos por *Acinetobacter spp.*, mas também desenvolvem uma forma de serem resistentes aos antibióticos que inibem a produção da beta-lactamase, como por exemplo, a produção de serina e metalo-beta-lactamases que acabam por inativar a atividade dos carbapenêmicos (MUGNIER *et al.*, 2008). A super expressão de bombas de efluxo por cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* resistentes, além de expulsar antimicrobianos como beta-lactâmicos do interior da célula, também expulsam outros antimicrobianos de outras classes, tais como: tetraciclinas, tigeciclina, quinolonas e clorafenicol (ASAAD *et al.*, 2021).

Algumas cepas também não possuem mais sensibilidade aos aminoglicosídeos, devido a ocorrência de mutações nos genes *parC* e *gyrA*, que codificam a topoisomerase IV e a DNA girase, respectivamente (HERNÁNDEZ *et al.*, 2021).

Recentemente, cientistas apontaram um novo transposon composto por dois genes que codificam resistência à amicacina e ao carbapenem, são eles: *blaNDM-1* que codifica a enzima New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1) atuando através da hidrólise de cefalosporinas, carbapenêmicos e penicilinas e o *aphA6* - que confere resistência à amicacina (SAMIRA *et al.*, 2022). No que diz respeito ao surgimento de cepas resistentes à colistina, pesquisadores acreditam que podem estar relacionados com alterações genéticas no DNA que levam a um erro na codificação das proteínas PmrA e PmrB que são dois componentes principais na regulação das modificações de lipopolissacarídeos (LPS) em bactérias Gram negativas (CHEN *et al.*, 2013).

As cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* são caracterizadas como “naturalmente transformáveis” por conta da plasticidade e facilidade em adquirir mecanismos de resistência e foi reconhecido pela OMS em 2017 como um dos

microrganismos que mais necessitam de atenção de pesquisadores. Além de adquirir formas de resistência, são capazes de compartilhar esse material genético com outros microrganismos que podem adquirir resistência também. A Organização Mundial de Saúde (OMS) levou em consideração os seguintes critérios para o desenvolvimento de resistência que são: tempo de tratamento hospitalar, índice de mortalidade, histórico de resistência em um determinado corpo social, prevenção e disseminação zoonótica ou entre humanos. (WHO, 2017).

As associações entre antimicrobianos constituem uma opção terapêutica com potencial sucesso para o tratamento de infecções causadas por cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* resistentes ou não. Um exemplo de associação sinérgica é quando se utiliza beta-lactâmicos em associação com inibidores de lactamases, como por exemplo, um carbapenêmico ou um outro antibiótico que inclua em sua formulação o sulbactam (FISHBAIN *et al.*, 2010).

### 3.2 MÉTODOS PARA O ESTUDO DE ASSOCIAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS

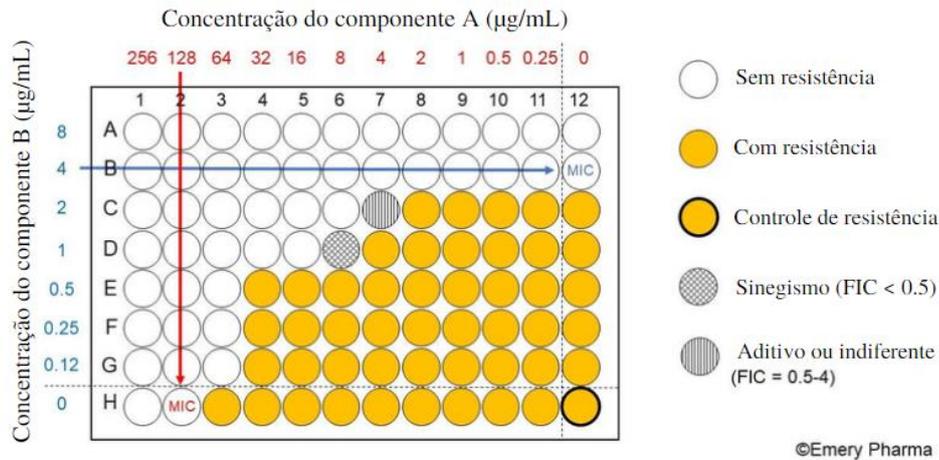
Existem diversos métodos para se avaliar a atividade antimicrobiana, um deles é a cinética bactericida ou também denominada *Time Kill*. Esse método é considerado padrão e com ele é possível determinar o sinergismo ou antagonismo entre antimicrobianos, avaliando o potencial bactericida. Recebe esse nome por avaliar o tempo em que o antimicrobiano é capaz de matar as bactérias. É um método amplamente utilizado por ser eficiente, utilizar-se de um menor tempo para execução e menor quantidade de materiais quando se compara com outras técnicas (NOGUEIRA *et al.*, 2012).

Entretanto, quando busca a avaliação da interação entre compostos antimicrobianos para determinar se a associação de duas drogas resulta em um sinergismo, antagonismo, indiferença ou aditividade, utiliza-se outros tipos de testes. Como o método mais utilizado por oferecer um resultado de alto rendimento e em um espaço de tempo curto, podemos citar o tabuleiro de xadrez ou *checkerboard* (CB) (figura 4), que foi descrito pela primeira vez por Berenbaum (1978) e consiste em uma técnica realizada a partir de uma adaptação da técnica de determinação da Concentração Inibitória Mínima em microdiluição em caldo.

Esse método é realizado em uma microplaca de 96 poços, onde, os compostos antimicrobianos são diluídos e dispostos em série nos micropoços contendo previamente meio de cultura, recebem posteriormente o inóculo do microrganismo de interesse, incubando-se por 24 horas para obtenção do resultado. Esse resultado é expresso em um índice determinado

de Concentração Inibitória Fracionada, de modo que, quanto maior o valor desse índice, menor é o nível de interação entre os compostos em teste.

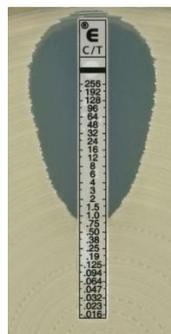
Figura 4: Método *Checkerboard*



Fonte: Adaptado de Emery Pharma

Outro método amplamente utilizado é o E-test (figura 5), que possui variações a depender da finalidade da pesquisa em questão. De modo geral, são utilizadas tiras impregnadas com os antimicrobianos padronizados em concentrações predeterminadas para avaliar combinações entre os compostos. Como relatado anteriormente, existem diferentes métodos de aplicação do E-test, são eles: método cruzado, método de razão, método de ágar e o método de concentração inibitória mínima do E-test (LAISHRAM *et al*, 2017).

Figura 5: ETEST



Fonte: Biomerieux

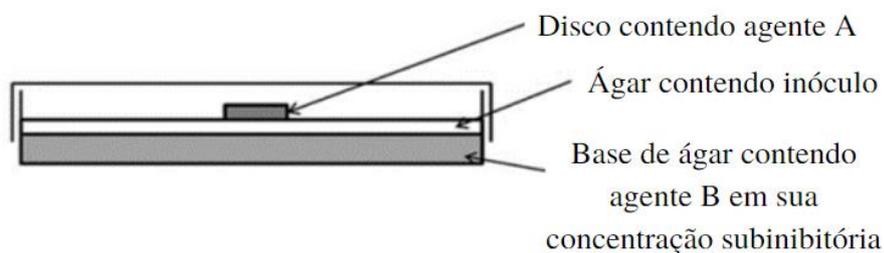
A diluição em caldo e o método de difusão em disco também são técnicas utilizadas para determinar a sensibilidade de microrganismos a determinados antimicrobianos que estão

impregnados sem concentrações crescentes e padronizados em fitas de papel. Entretanto, o método utilizado neste estudo foi o *Overlay Inoculum Susceptibility Disc* (LAISHRAM *et al.*, 2017).

### 3.2.1 *Overlay Inoculum Susceptibility Disc*

O Método de *Overlay Inoculum Susceptibility Disc* (figura 6) consiste em um teste realizado em meio sólido para avaliar a interação entre antimicrobianos. O antimicrobiano é incorporado ao meio em concentração previamente estabelecida assim como os microrganismos obtendo-se assim uma sobreposição a qual são adicionados discos de papel contendo antimicrobianos. Paralelamente a esse procedimento, placas contendo apenas o meio de cultura sem a presença do antimicrobiano são utilizadas como controle. O sinergismo é confirmado após a observação de um aumento de 19% no diâmetro da zona de inibição do crescimento do microrganismo em torno do disco, não ocorrendo esse aumento é considerada uma interação indiferente (CHINWUBA *et al.*, 1991; LAISHRAM *et al.*, 2017).

Figura 6: Representação do Método *Overlay Inoculum Susceptibility Disc*



Fonte: Adaptado de Shaktiet *al.*, 2017

### 3.3 TRATAMENTO

Na clínica médica, o tratamento para infecções com o complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* ainda representa um grande desafio, visto que, a maioria das cepas isoladas são produtoras de carbapenemases e metalo-betalactamase e com isso, a probabilidade dessas cepas possuírem resistência a maioria dos antibióticos aumenta e os esquemas terapêuticos tornam-se cada vez mais limitados (ODONNELL *et al.*, 2021; BUTLER *et al.*, 2019;). As opções mais escolhidas para o tratamento de infecções com o

complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* são limitados às polimixinas, tetraciclinas e sulbactam prescritos individualmente ou em combinações (THOMAS *et al.*, 2019).

Entretanto, a nefrotoxicidade causada pelas polimixinas é um fator que transforma esse tratamento em um desafio (GOGRY *et al.*, 2021). Diante desse fato, torna-se indispensável a busca por novas moléculas ativas e mais eficazes para o tratamento de infecções causadas pelo complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

### 3.3.1 Naftoquinonas

O surgimento de cepas de *Acinetobacter baumannii* multidroga resistente é uma realidade enfrentada em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), onde, se faz presente a pressão seletiva de antibióticos. Visto que, o uso repentino de antibióticos agrava o risco de surgimento de cepas resistentes, de modo que, os microrganismos considerados sensíveis morrem nessa pressão exercida pela molécula antimicrobiana, restando apenas aquelas que, de certa forma, criaram formas de resistir ao tratamento. Esse fator diminui as probabilidades de tratamento, limitando-o, de modo que, a presença de antibióticos com atividade antimicrobiana para cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* é limitada a poucos fármacos (NASR *et al.*, 2020).

A opção de tratamento para cepas resistentes a carbapenêmicos está cada vez mais reduzido, tendo polimixinas, tigeciclina, aminoglicosídeos e suas combinações como esquemas terapêuticos (STAMATIS *et al.*, 2020). Nesse contexto de resistência, é necessária a pesquisa por novas moléculas ativas para ampliar as formas de tratamento das infecções provocadas por este microrganismo.

Dentre as inúmeras moléculas em estudo para conter o avanço da colonização desses microrganismos em humanos, temos as naftoquinonas. As naftoquinonas são metabólitos secundários de microrganismos, algas e plantas superiores com inúmeras propriedades farmacológicas e altamente reativos (TAHARA *et al.*, 2020; WELLINGTON *et al.*, 2020).

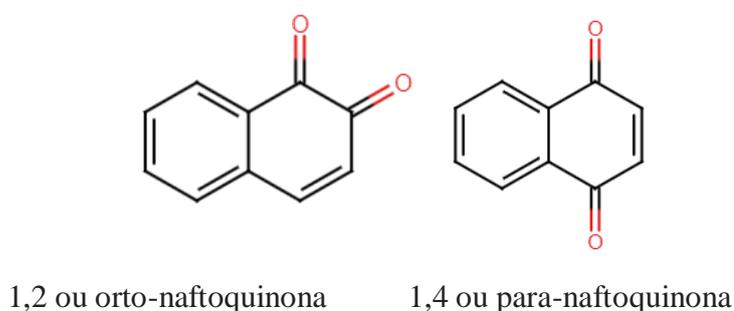
A estrutura química das naftoquinonas é determinada pela conjugação de dois anéis heterocíclicos nitrogenados, que podem apresentar-se de duas formas estruturais diferentes, sendo elas: 1,2 ou orto-quinonoídica (quando as carbonilas estão unidas) e 1,4, ou para-quinonoídica (quando as carbonilas estão separadas por dois átomos de carbonos) (Figura 7) (TANDON *et al.*, 2013). As naftoquinonas são formadas através da biotransformação de catecolaminas, estrógenos e outros compostos endógenos (LOPES *et al.*, 1996).

As naftoquinonas são caracterizadas por possuírem em sua conformação química um anel naftalênico. Esse grupo possui derivados com diferentes propriedades biológicas, que são nomeados a depender da posição de suas carbonilas (SILVA *et al.*, 2003). Esses derivados são descritos na literatura como potenciais agentes causadores de interferência na atividade de enzimas que fazem parte do processo de multiplicação celular (KLAUS *et al.*, 2010). O grupo de interesse nesse trabalho é o 1,2-naftoquinona, o qual recebeu essa nomenclatura por possuir sua porção quinona nos carbonos 1 e 2 da sua estrutura química (TANDON *et al.*, 2013) (figura 7).

Além das naftoquinonas existem outros grupos que são classificados a depender do anel aromático que esteja presente em sua estrutura química, tais como, as benzoquinonas e antraquinonas, ambos compostos bioativos, que possuem atividade antineoplásicas e antimicrobianas (ZHANG *et al.*, 2016; YADAV *et al.*, 2019).

As naftoquinonas possuem diversas atividades biológicas importantes para a indústria farmacêutica e, devido a isso, são consideradas estruturas moleculares de interesse na química medicinal, sendo relatada na literatura científica com diversas atividades farmacológicas dentre elas: antitumorais (SANTANA *et al.*, 1968), anti-inflamatórias (ALMEIDA *et al.*, 1990), antiprotozoária (TEIXEIRA *et al.*, 2001), e antimicrobianas (SILVA *et al.*, 2003). Em destaque para sua atividade antiviral que, de acordo com o contexto pandêmico atual, no ano de 2020, pesquisadores realizaram um estudo demonstrando o potencial da ubiquinona mitocondrial como uma possível terapia secundária ou até mesmo tratamento para a COVID-19 (OUYANG *et al.*, 2020).

Figura 7: Formas isoméricas da naftoquinona



Fonte: A autora/Adaptado de TANDON *et al.*, 2013

As naftoquinonas são moléculas consideradas citotóxicas pois induzem a apoptose celular. Essa indução ocorre pelo fato dessas moléculas formar hidroxiquinonas, podendo perder um elétron a partir do processo de auto oxidação e formar semiquinonas, ambas moléculas são altamente reativas (RAVICHANDIRAN *et al.*, 2019).

### 3.3.1.1 Beta-lapachona

A beta-lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona) é um metabólito secundário, obtido através do Lapachol extraído da casca de várias plantas brasileiras, a exemplo do Lapacho (*Tabebuia avellanedae*) (figura 8) pertencente à família Bignoniaceae (PINTO e CASTRO, 2009). Conhecida popularmente como Lapacho, Ipê-Roxo ou Pau d'Arco, a *Tabebuia avellanedae*, é originária das regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, tendo domínio biogeográfico do Brasil ao norte da Argentina (WILLIAMS *et al.*, 1936; DA SILVA *et al.*, 2003).

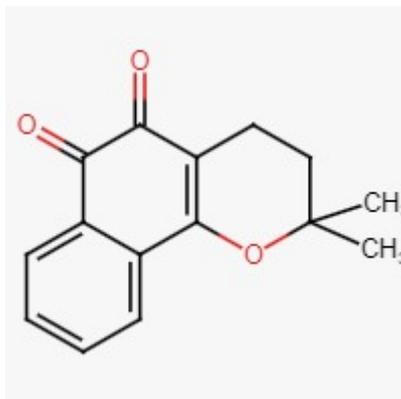
Figura 8: *Tabebuia avellanedae*



Fonte: Horto Didático de Plantas Medicinais do HU/CCS (2020)

A medicina popular colaborou positivamente para o surgimento de interesses científicos acerca do Lapacho, visto que, antigamente as pessoas utilizavam-se da casca da planta em questão como um potencial anti-inflamatório, antineoplásico, diurético e analgésico (HUSSAIN *et al.*, 2007). A beta-lapachona (figura 9) é conhecida por possuir uma variedade de propriedades farmacológicas, incluindo atividades anticancerígena (SANTANA *et al.*, 1968), anti-inflamatória (ALMEIDA *et al.*, 1990), antiprotozoária (TEIXEIRA *et al.*, 2001), e antimicrobianas (SILVA *et al.*, 2003).

Figura 9: Estrutura química da beta-lapachona



Fonte: O autor/Adaptado de Sigma-Aldrich (2022)

A beta-lapachona também pode ser isolada através do lomatiol (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>), metabólito secundário de uma planta pertencente à família *Proteaceae*, oriunda do Hemisfério Sul (EYONG *et al.*, 2015)

Uma característica química importante é seu potencial antioxidante, no qual, na presença de um substrato quinoídico, reduz um ou dois elétrons e, conseqüentemente, sofre um processo conhecido por biorredução enzimática pelo NADPH, esse ciclo é conhecido como redox e o produto dessa reação são semiquinonas instáveis. Essa reação é comum das quinonas e partir dela ocorre o surgimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, em contato com o DNA, promove sua fragmentação (SILVA *et al.*, 2017). Essa fragmentação do DNA ocorre através de uma reação conhecida por peroxidação lipídica, na qual, os radicais livres das ROS irão atrair os elétrons dos lípidos presentes nas membranas celulares. Dessa forma, a beta-lapachona é considerada citotóxica, pois quando em contato com macromoléculas celular promove um estresse oxidativo e posteriormente podem ocasionar a apoptose celular (VESKOUKIS *et al.*, 2012).

A beta-lapachona também pode causar um retardo no ciclo mitótico e gerar um bloqueio na expressão dos genes das proteínas inibidoras de apoptose, ocasionando uma morte celular induzida. O mecanismo de apoptose celular induzido pela beta-lapachona é alvo de muitos estudos científicos, nos quais demonstraram aumento significativo da p53 fosforilada, conduzindo a célula a apoptose (SOUSA *et al.*, 2016).

### 3.3.2 Amicacina

A amicacina é um antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos, que são um dos primeiros recursos terapêuticos para tratar infecções causadas por Gram-negativos (SERIO *et al.*, 2017). Entretanto, a resistência aos aminoglicosídeos é uma realidade enfrentada por pesquisadores, visto que, as bactérias vêm desenvolvendo inúmeras formas de resistir a esses fármacos antibióticos (RAMIREZ *et al.*, 2019).

Seu mecanismo de ação é considerado bactericida, pois inibe a síntese proteica através da sua ligação com o RNA ribossomal a partir da subunidade 30S do ribossomo bacteriano da célula bacteriana (GOLAN *et al.*, 2014).

### 3.3.3 Ciprofloxacino

O cloridrato de ciprofloxacino é pertencente a classe das fluoroquinolonas, cujo mecanismo de ação é através da inibição da enzima DNA topoisomerase I, conseqüentemente, causando danos celulares as bactérias (OJKIC *et al.*, 2020). O grande problema dessa classe é que a ação é tardia, isto é, mesmo em contato com o composto antimicrobiano, ainda é possível observar células viáveis por cerca de uma a duas horas após a exposição, esse fator pode estar atrelado ao desenvolvimento de fatores de resistência. (WICKENS *et al.*, 2000; BOS *et al.*, 2015).

### 3.3.4 Cloridrato de Cefepime

O cloridrato de cefepime é um antimicrobiano pertencente a quarta geração da classe das cefalosporinas, possuindo um espectro amplo de eficácia para microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Esse antimicrobiano tem uma janela terapêutica ampla, sendo considerada segura mesmo em casos em que o paciente precise de doses mais altas, entretanto, é necessário o acompanhamento principalmente em pessoas com insuficiência renal ou condições neurológicas para que seja evitado o acúmulo renal do antimicrobiano no paciente (PAIS *et al.*, 2022). É um antimicrobiano indicado para infecções bacterianas em vários sistemas, dentre eles: trato urinário, epitelial e respiratório. Além disso, também são prescritos para infecções intra-abdominais graves e neutropenia (FDA, 2017).

### 3.3.5 Polimixinas

#### 3.3.5.1 Colistina

A Colistina é um antibiótico polipeptídico, isto é, da classe das polimixinas e, por esse motivo, também é conhecido como polimixina E. É considerada como um dos últimos recursos terapêuticos em infecções por microrganismos multirresistentes, por conta desse fator, o surgimento de cepas resistentes a ação desse composto é um grande problema. Seu mecanismo de ação é voltado para a alteração da permeabilidade celular, através da ligação entre moléculas de lipídios A aniônicos de Gram-negativas, levando ao extravasamento celular e, conseqüentemente, à lise (ANDRADE *et al.*, 2020). Entretanto, a colistina é considerada nefrotóxica e neurotóxica, fator que limita sua utilização em hospitais (GOGRY *et al.*, 2021).

#### 3.3.5.2 Polimixina B

São antibióticos polipeptídicos catiônicos, que atuam causando morte celular bacteriana através da sua ligação com o lipídeo A dos lipopolissacarídeos presentes na membrana celular das bactérias Gram-negativas, por este motivo, as polimixinas são ineficazes para Gram-positivas (HANCOCK, 1997; CLAUSELL *et al.*, 2007; MEREDITH *et al.*, 2009). Esse processo acarreta um aumento da permeabilidade da membrana celular bacteriana, extravasamento de constituintes celulares e conseqüentemente, alise celular (VELKOV *et al.*, 2010; YUN *et al.*, 2018).

### 3.3.6 Gentamicina

A gentamicina, assim como a amicacina, é um aminoglicosídeo e possui seu mecanismo de ação voltado para a indução de estresse no retículo endoplasmático (RE) sendo que, diferente da amicacina, atua através da ligação ao ribossomo 80S eucariótico (PROKHOROVA *et al.*, 2017). Além disso, a gentamicina também é responsável por ativar a resposta de proteína desdobrada (UPR) e danifica as mitocôndrias em células eucarióticas (PEYROU *et al.*, 2007). Devido a isto, as preocupações quanto ao uso da gentamicina giram em torno da sua potencial nefrotoxicidade, visto que, aminoglicosídeos representam um potencial risco a nefrotoxicidade induzida e, conseqüentemente, o surgimento de lesões

renais agudas, causando a suspensão do medicamento na maioria dos casos (FOWLER *et al.*, 2006).

### 3.3.7 Imipenem

Pertencente a classe dos beta-lactâmicos, o imipenem tem seu mecanismo de ação baseado na ligação covalente entre as proteínas de ligação a penicilina, que são responsáveis por catalisar a ligação das cadeias poliméricas de peptidoglicano, causando danos a célula e ocasionando na inibição da síntese da parede celular bacteriana (PAPP-WALLACE *et al.*, 2011). Um grande obstáculo para a eficácia desse fármaco é o surgimento de cepas produtoras de carbapenemases, forma de resistência para os  $\beta$ -lactâmicos, um exemplo são as cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (AYOUB *et al.*, 2020).

### 3.3.8 Rifampicina

A rifampicina é um antimicrobiano pertencente ao grupo dos macrocíclicos, é amplamente utilizado no tratamento de tuberculose (TOOSKY *et al.*, 2014). O surgimento de cepas resistentes a esse fármaco antimicrobiano, se dá devido a mutações na subunidade alvo do mesmo, que é a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, entretanto, outros mecanismos de tolerância a rifampicina estão sendo relatados na literatura (MILLER *et al.*, 1994; REGO *et al.*, 2017).

### 3.3.9 Tigeciclina

A tigeciclina é membro da classe das glicilciclinas, e possui atividade eficaz contra um grande espectro de patógenos importantes. É derivado da tetraciclina, foi idealizada inicialmente para superar os seus efeitos causadores de resistência (STEIN *et al.*, 2013). Seu mecanismo de ação se dá pela inibição do crescimento bacteriano através do bloqueio da entrada de RNA transportadores e da ligação ao ribossomo 30S da célula bacteriana, o que irá acarretar em um impedimento da síntese proteica e inibição do crescimento bacteriano (JENNER *et al.*, 2013). Cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a tigeciclina vem surgindo devido a sua característica de superexpressão de bombas de efluxo e mutação dos sítios responsáveis pela ligação do antimicrobiano em ribossomos (HAMMERSTROM *et al.*, 2015).

### **3.3.10 Vancomicina**

A vancomicina é um antibiótico da classe dos glicopeptídicos, é recomendada em casos de infecções graves, nas quais os pacientes ficam sob supervisão médica para que a dose seja efetiva e para evitar lesão renal ocasionada pelo fármaco (TAPLITZ *et al.*, 2018). Seu mecanismo de ação é pautado na inibição da reticulação do peptidoglicano, causando danos celulares, inibindo o crescimento bacteriano e ocasionando a ruptura da membrana plasmática (YAO *et al.*, 2005).

### **3.3.11 Sulfametoxazol-trimetoprima**

É um composto antibiótico que possui em sinergismo os agentes antimicrobianos: sulfametoxazol e a trimetoprima. É um antibiótico de amplo espectro, que atuam em sinergia contra uma ampla variedade de bactérias, bloqueando a síntese de ácido fólico (utilizado para síntese de DNA e RNA em bactérias), dessa forma, é considerado um antimicrobiano de amplo espectro (HAND *et al.*, 2016).

### **3.3.12 Levofloxacino**

O levofloxacino é um antibiótico fluoroquinolona, com amplo aspecto, principalmente para tratamento de pneumonia (KALIL *et al.*, 2016) Entretanto, o surgimento de cepas resistentes ao levofloxacino vem sendo reportada, fator que vem diminuindo sua utilização como forma de tratamento (PAIVA *et al.*, 2015).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

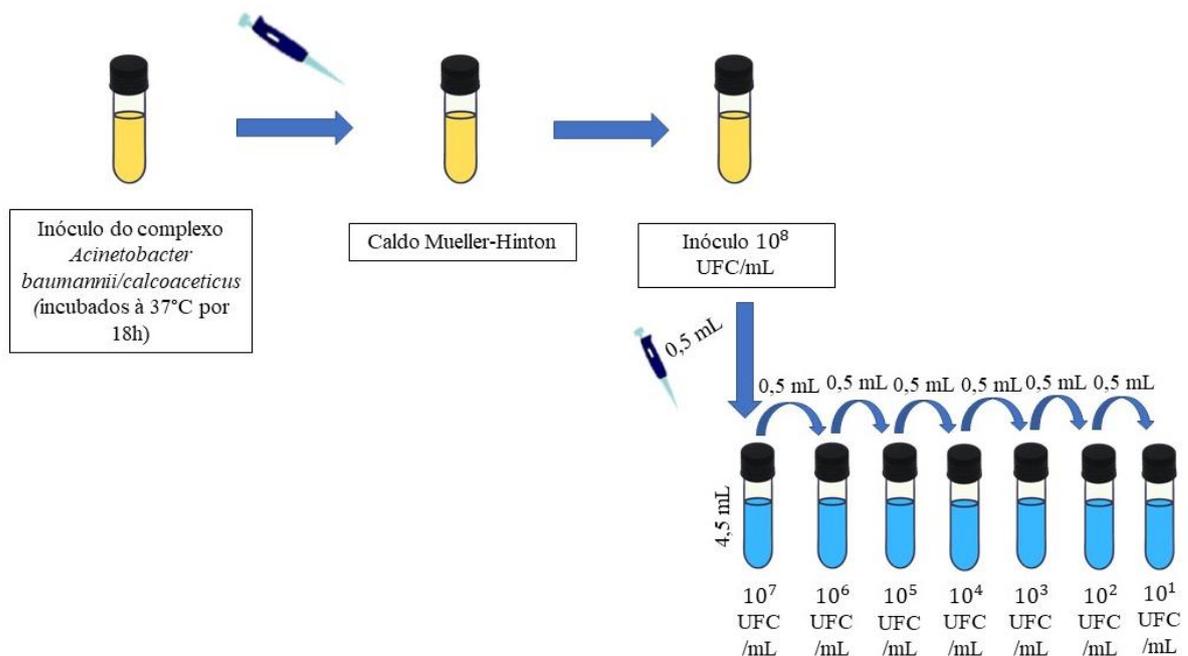
### 4.1 MICRORGANISMOS E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Dez cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* resistentes aos carbapenêmicos foram obtidas de culturas-estoques mantidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos–Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco. Esses microrganismos foram cultivados em caldo Mueller Hinton (MHB), incubados à 37° C por 18 horas.

A origem do isolamento das cepas e seus respectivos fenótipos de resistências para antibióticos comumente utilizados para o tratamento de infecções bacterianas estão dispostos na tabela 1, bem como, uma cepa padrão (ATCC 19606) obtida do American Type Culture Collection.

Para padronização do inóculo (figura 10), as culturas foram diluídas em solução salina esterilizada para ao final obter um inóculo, padronizado pela escala de Mc Farland de  $10^6$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL confirmados por enumeração das colônias.

Figura 10: Padronização do inóculo do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*



Fonte: A autora (2022)

Tabela 1: Origem do Isolamento e fenótipo de resistência de dez cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*

Cepas do complexo <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	Origem	Fenótipo de resistência determinado pelo Phoenix™ BD	Interpretação	Comentários
LFBM 03	Fragmento do osso	AMI, CIP, GET, IPM, LEV, MER, SMX-TMP	R	Potencial Produtor de Carbapenemase
LFBM 04	Swab Retal	CIP, COL, GET, IPM, LEV, MER, SMX-TMP	R	Potencial Produtor de Metallo-Beta-Lactamase
LFBM 05	Sangue	AMI, CIP, COL, GET, LEV, MER, IPM, SMX-TMP	R	Potencial Produtor de Carbapenemase e Metallo-Beta-Lactamase
LFBM 08	Secreção Traqueal	AMI, CIP, COL, GET, IPM, LEV, MER, SMX-TMP	R	Potencial Produtor de Carbapenemase
LFBM 20	Secreção Traqueal	AMI, CIP, GET, IPM, LEV, MERO, SMX-TMP	R	Potencial Produtor de Carbapenemase
LFBM 22	Sangue	AMI, GET, CIP, LEV, MER, IPM, SMX-TMP	R	Potencial Produtor de Carbapenemase e Metallo-Beta-Lactamase
LFBM 23	Ponta de cateter	AMI, CIP, GET, MER, IPM, LEV, SMX-TMP	R	Potencial Produtor de Carbapenemase e Metallo-Beta-Lactamase
LFBM 25	Sangue	AMI, AMP, CIP, COL, GET, LEV, MER, SMX-TMP, VAN	R	Potencial Produtor de Carbapenemase e Metallo-Beta-Lactamase
LFBM 26	Ferida	AMI, CIP, COL, GET, IPM, LEV, MER, SMX-TMP	R	Potencial Produtor de Carbapenemase

AMP: Ampicilina; AMI: Amicacina; CIP: Ciprofloxacina; COL: Colistina; GEN: Gentamicina; MER: Meropenem; SMX-TMP – Sulfametoxazol/Trimetoprim; IPM: Imipenem; LEV: Levofloxacina; R: Resistente; VAN: Vancomicina; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de microrganismos.

## 4.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os agentes antimicrobianos foram obtidos da Sigma-Aldrich (USA) e foram escolhidos com base em seus mecanismos de ação: vancomicina, imipenem, ciprofloxacino, amicacina, gentamicina, rifamicina, tigeciclina e cloridrato de cefepina.

O critério de resistência foi definido para cada agente antimicrobiano com base ao que preconiza o Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) 2020: amicacina (AMI, CIM  $\geq$  64  $\mu\text{g/mL}$ ); imipenem (IPM, CIM  $\geq$  8 $\mu\text{g/mL}$ ); vancomicina (VAN, CIM  $\geq$  4 $\mu\text{g/mL}$ ); ciprofloxacina (CIP, CIM  $\geq$  4 $\mu\text{g/mL}$ ); gentamicina (GEN, CIM  $\geq$ 16 $\mu\text{g /mL}$ ); tigeciclina (TGC, CIM  $\geq$ 16 $\mu\text{g / mL}$ ).

A  $\beta$ -lapachona, foi obtida no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

## 4.3 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE BETA-LAPACHONA

A beta-lapachona foi obtida por síntese química através do lapachol e esse por extração química da serragem do ipê roxo *Tabebuia avellanedae* L., de acordo com a metodologia descrita por Gonçalves de Lima et al. 1962. Os cristais de coloração avermelhada foram pesados com auxílio de uma balança analítica e solubilizados com etanol/tween80/H<sub>2</sub>O(1,0/0,5/8,5 v/v). A solução foi esterilizada por filtração a vácuo (figura 11) utilizando uma membrana Milipore® de porosidade 0,22 $\mu\text{m}$  e 150 $\mu\text{m}$  de espessura.

## 4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada utilizando o método de macrodiluição, seguindo as recomendações estabelecidas pelo CLSI (2020) com algumas modificações. Diluições seriadas da beta-lapachona foram preparadas de forma a obter concentrações que variaram de 32 a 1024  $\mu\text{g/mL}$ . Ao final, 4,5 da suspensão bacteriana padronizada, foram dispensados em todos os tubos.

Uma avaliação antimicrobiana do sistema etanol/Tween 80/H<sub>2</sub>O (1,0/0,5/8,5 v/v) foi incluído neste estudo, para excluir a possibilidade de efeitos tóxicos sobre as cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

A CIM é considerada como a menor concentração dos agentes antimicrobianos capazes de inibir o crescimento bacteriano após 24 h de incubação a 37°C. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Figura 11: Filtração da solução de beta-lapachona

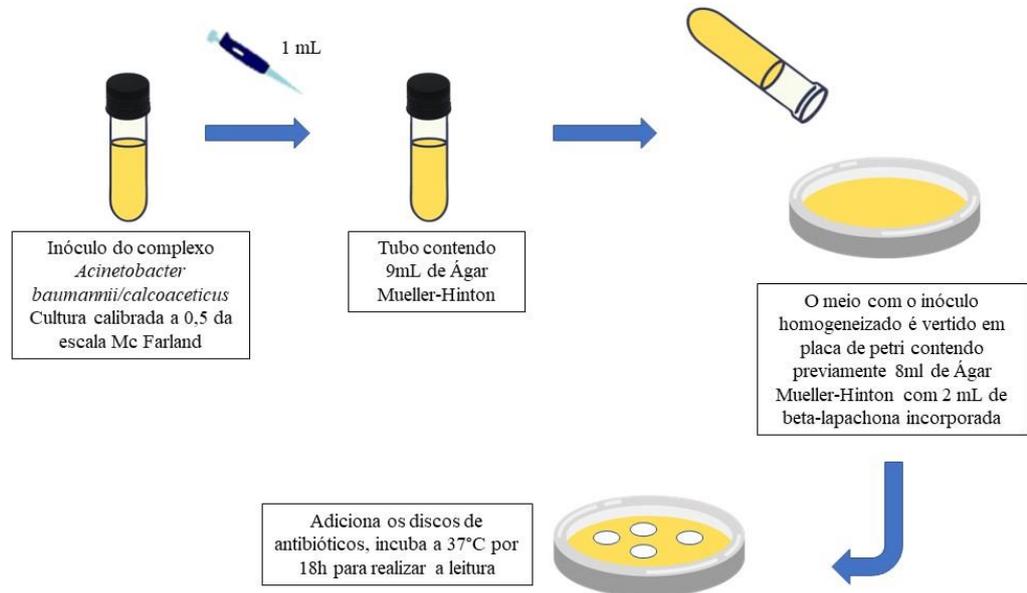


Fonte: A autora (2022)

#### 4.5 ASSOCIAÇÃO DA BETA-LAPACHONA AOS ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAIS

Para avaliação das associações de beta-lapachona com os discos de antimicrobianos: amicacina (30µg), ciprofloxacino (5µg), cefepime (30µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), rifampicina (5µg), tigeciclina e vancomicina foi utilizado o método *Overlay Inoculum Susceptibility Disc* descrito por Laishram e colaboradores (2017). O procedimento experimental (figura 12) é basicamente uma modificação o método de difusão em meio sólido. Uma solução de beta-lapachona em concentração equivalente a 1/20 da CIM (51,2 e 3,2 µg/mL) foi incorporada ao ágar Mueller-Hinton e vertidos sobre as placas. Em seguida sobre esse meio, o microrganismo foi incorporado ao meio de forma a conter  $10^6$  UFC/mL e vertido sobre a camada de ágar contendo a beta-lapachona já solidificado. As placas foram postas em superfície plana até total solidificação. Em seguida, discos de amicacina, ciprofloxacino, cloridrato de cefepima, gentamicina, imipenem, rifampicina, tigeciclina, e vancomicina foram dispostos sobre à superfície do meio de forma equidistante. As placas foram incubadas à 37° por 24 horas. Um aumento no diâmetro da zona de inibição (DZI) em torno do disco de 19% corresponde a um efeito sinérgico, <19% corresponde ao efeito aditivo e nenhuma variação do DZI é indicativo de indiferença (LAISHRAM *et al.*, 2017).

Figura 12: Método *Overlay Inoculum Susceptibility Disc* para determinação do sinergismo entre beta-lapachona e antimicrobianos



Fonte: A autora (2022)

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA BETA-LAPACHONA

Os valores para a CIM da beta-lapachona e dos antimicrobianos frente as dez cepas de *Acinetobacter baumannii* estão apresentados na tabela 2.

A  $\beta$ -lapachona apresentou uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) que variou entre 512 a 1024  $\mu\text{g/mL}$  (figura 13) para as dez cepas avaliadas nesse estudo.

Todas as cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* mostraram um perfil de resistência para todos os antimicrobianos avaliados exceto para a polimixina B cujos valores de CIM foram inferiores ou igual a 1.0.

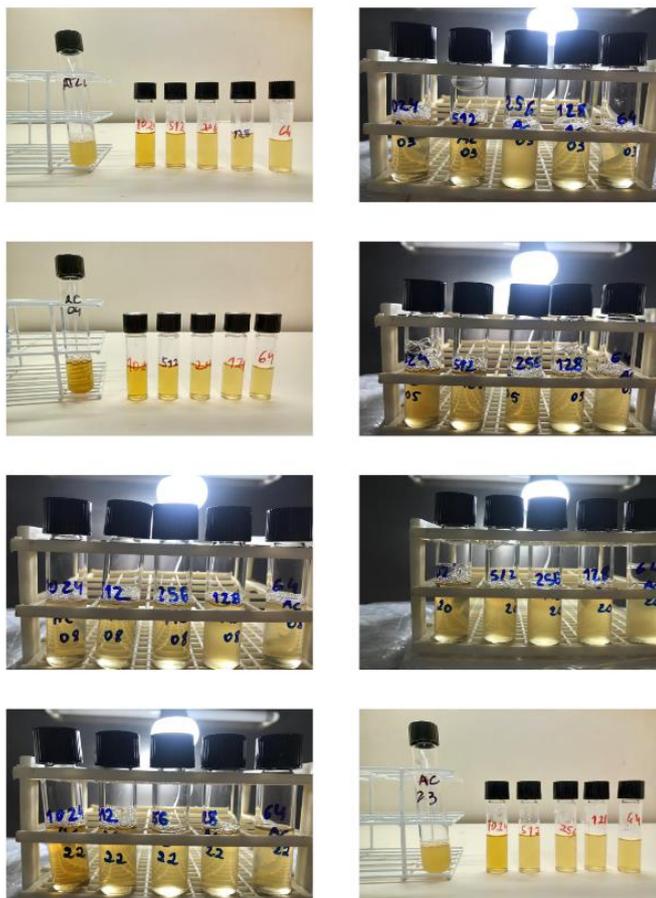
Apenas as cepas LFBM 04 e LFBM 20 mostraram sensibilidade à amicacina e a gentamicina.

Tabela 2- Concentração Inibitória Mínima da beta-lapachona e de antimicrobianos convencionais frente a cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*

Cepas do complexo <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) ( $\mu\text{g/mL}$ )								
	Beta-lapachona	AMI	CIP	GET	IPM	LEV	MER	POL-B	SMX-TMP
ATCC 19606	512								
LFBM 03	512	>32	>2	>8	>8	>4	>32	0.5	>2/38
LFBM 04	512	$\leq$ 8	R	$\leq$ 1	>8	>8	>32	0,5	>2/38
LFBM 05	1024	>32	>2	>8	>8	>4	>32	0.25	>2/38
LFBM 08	1024	>32	>2	>8	>8	>4	>32	0.5	>2/38
LFBM 20	1024	$\leq$ 8	>2	$\leq$ 2	>8	>4	>32	1.0	>2/38
LFBM 22	1024	>32	>2	>8	>8	>4	>32	1.0	2/38
LFBM 23	512	>32	>2	>8	>8	>32	>32	1.0	>2/38
LFBM 25	1024	>32	>2	>8	>8	>4	>32	0,5	>2/38
LFBM 26	1024	>32	>32	>8	>8	>4	>32	0,5	>2/38

AMI: Amicacina; CIP: Ciprofloxacina; CPM: Cloridrato de Cefepime; GEN: gentamicina; IPM: Imipenem; MER: Meropenem; VAN: Vancomicina; POL-B: Polimixina-B; SMX-TMP: sulfametoxazol-trimetoprima; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de microrganismos.

Figura 13: Determinação da Concentração Inibitória Mínima da beta-lapachona frente as cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* LFBM 26; LFBM 03, LFBM 04, LFBM 05, LFBM 08, LFBM 20, LFBM 22, LFBM 23



Fonte: A autora (2022)

AC: *Acinetobacter baumannii*; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de micro-organismos.

## 5.2 ASSOCIAÇÃO BETA-LAPACHONA-ANTIMICROBIANOS

A atividade da associação beta-lapachona e antimicrobianos frente a cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* estão apresentadas na tabela 3.

Algumas associações mostraram-se sinérgicas, caracterizada por um aumento percentual do halo de inibição do crescimento microbiano que variou de a 21,49 a 64,70%.

Os antibióticos que apresentaram sinergismo foram: amicacina, para as cepas LFBM 4, LFBM 5, LFBM 20, LFBM 22, LFBM 23 e LFBM 25; Cloridrato de Cefepima para as

cepas ATCC 19606, LFBM 4, LFBM 8, LFBM 20, LFBM 22, e LFBM 23; vancomicina para as cepas LFBM 5, LFBM 25 e LFBM 26.

A associação beta-lapachona-amicacina e beta-lapachona-cefepime foram as mais sinérgicas visto que, 60% das cepas apresentaram um aumento percentual nos halos de inibição que variou de 21,49% a 59,20% e 34,36% a 64,70%, respectivamente.

Um efeito indiferente foi observado para os outros antimicrobianos (ciprofloxacino, gentamicina, imipenem, rifampicina e tigeciclina) em associação com a beta-lapachona. A cepa LFBM 03 não apresentou sinergismo para nenhum dos antimicrobianos avaliados.

Tabela 3: Associação entre beta-lapachona e antimicrobianos frente a cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* utilizando o método *Overlay Inoculum Susceptibility Disc*.

<i>Acinetobacter baumannii</i>	Drogas	Diâmetro da Zona de Inibição (DZI ± DP)		Percentual de aumento do Diâmetro da Zona de Inibição ± EPM	Interpretação
		Controle (mm)	Teste (mm)		
ATCC 19606	AMI	8,55 ± 0,07	8,65 ± 0,07	0,52 ± 0	ADITIVO
	CIP	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	CPM	0 ± 0	6,53 ± 0,42	34,36 ± 0,21	SINÉRGICO
	GET	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	IPM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	RIF	15,59 ± 0,02	15,85 ± 0,21	1,34 ± 1,23	INDIFERENTE
	TGC	10,08 ± 0,11	10,1 ± 0,14	0,105 ± 0,14	INDIFERENTE
	VAN	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
LFBM 03	AMI	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	CIP	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	CPM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	GET	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	IPM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	RIF	13,02 ± 0,03	13,87 ± 0,53	4,47 ± 2,60	INDIFERENTE

	TGC	$8,5 \pm 0,14$	$8,65 \pm 0,07$	$0,78 \pm 1,11$	INDIFERENTE
	VAN	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	INDIFERENTE
LFBM 04	AMI	$0 \pm 0$	$11,25 \pm 0,02$	$59,20 \pm 0,14$	SINÉRGICO
	CIP	$18,5 \pm 0,14$	$18,76 \pm 0,33$	$1,365 \pm 1,03$	INDIFERENTE
	CPM	$0 \pm 0$	$10,59 \pm 0,12$	$55,73 \pm 0,67$	SINÉRGICO
	GET	$10,75 \pm 0,35$	$11,74 \pm 1,05$	$5,235 \pm 3,68$	INDIFERENTE
	IPM	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	INDIFERENTE
	RIF	$12,44 \pm 0,03$	$12,68 \pm 0,25$	$1,235 \pm 1,15$	INDIFERENTE
	TGC	$9 \pm 0$	$9 \pm 0$	$0 \pm 0$	INDIFERENTE
	VAN	$9,45 \pm 0,35$	$9,65 \pm 0,21$	$1,04 \pm 0,74$	INDIFERENTE
LFBM 05	AMI	$0 \pm 0$	$8,35 \pm 0,07$	$43,90 \pm 0,43$	SINÉRGICO
	CIP	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	INDIFERENTE
	CPM	$11,27 \pm 0,55$	$11,6 \pm 0,14$	$1,70 \pm 2,13$	INDIFERENTE
	GET	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	INDIFERENTE
	IPM	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	INDIFERENTE
	RIF	$11,98 \pm 0,02$	$12,22 \pm 0,31$	$1,25 \pm 1,55$	INDIFERENTE
	TGC	$10,015 \pm 0,2$	$10,22 \pm 0,07$	$1,10 \pm 1,56$	INDIFERENTE
	VAN	$0 \pm 0$	6,445	$33,91 \pm 0,40$	SINÉRGICO
LFBM 08	AMI	$7,3 \pm 0,07$	$9,05 \pm 0,07$	$8,94 \pm 0,74$	INDIFERENTE

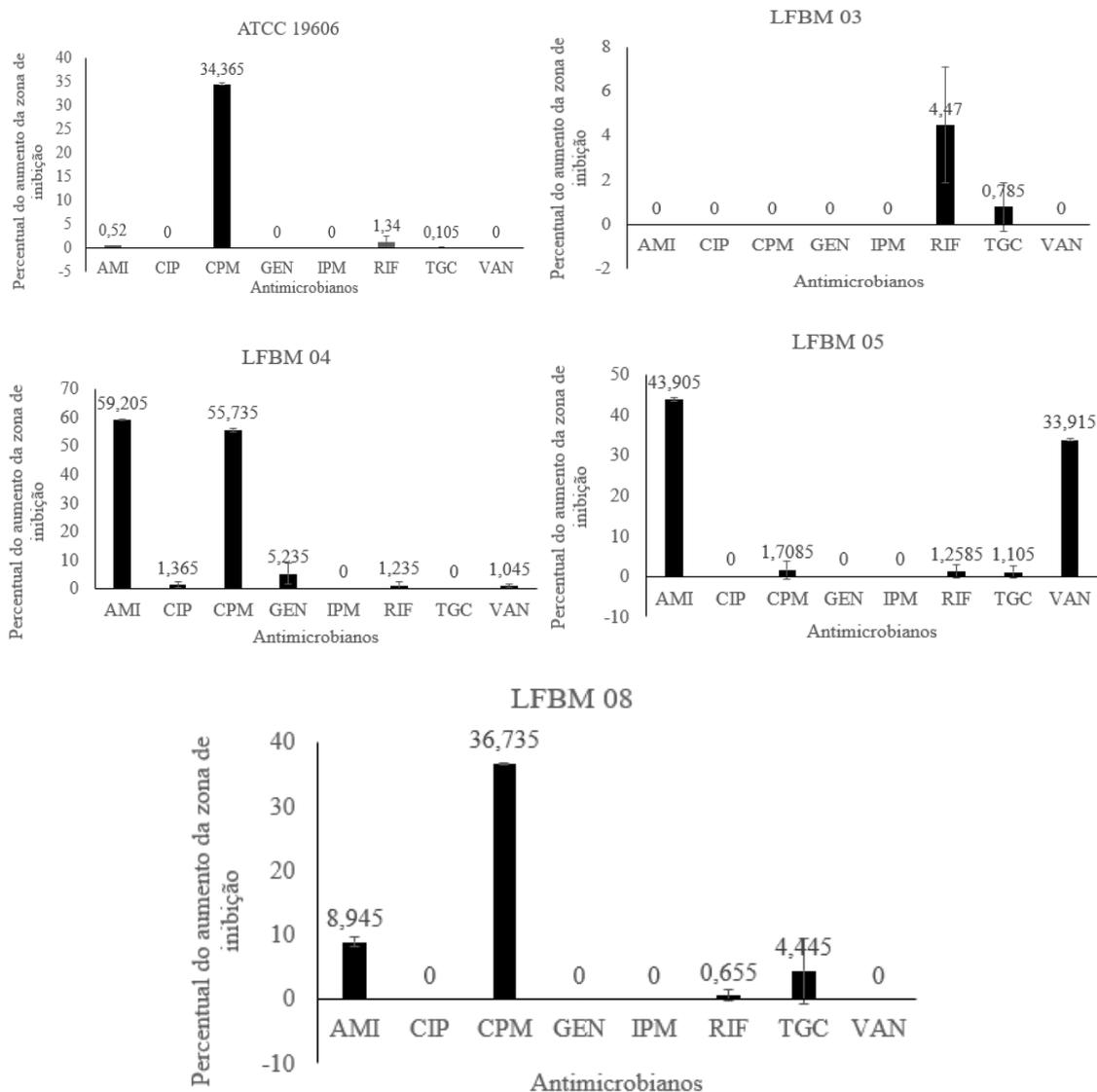
	CIP	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	CPM	0± 0	6,98± 0,02	36,73± 0,14	SINÉRGICO
	GET	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	IPM	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	RIF	13,44 ± 0,19	13,56± 0,02	0,65± 0,92	INDIFERENTE
	TGC	7,2 ± 0,28	8,04± 1,23	4,445± 5,02	INDIFERENTE
	VAN	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	AMI	8,77 ± 0,58	12,86± 0,91	21,49± 7,92	SINÉRGICO
	CIP	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	CPM	0± 0	8,68± 0,25	45,68± 1,34	SINÉRGICO
LFBM 20	GET	9,47± 0,74	10,25± 0,35	4,10± 5,80	INDIFERENTE
	IPM	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	RIF	13,59± 0,57	14,36± 0,19	4,05± 2	INDIFERENTE
	TGC	9,5± 0	9,58± 0,12	0,44± 0,62	INDIFERENTE
	VAN	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	AMI	0± 0	8,08± 0,16	42,54 ± 0,85	SINÉRGICO
	CIP	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
LFBM 22	CPM	0± 0	6,785± 0,30	35,70± 1,60	SINÉRGICO
	GET	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE

	IPM	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	RIF	15,1± 0,14	15,82± 0,24	3,81± 2,05	INDIFERENTE
	TGC	10,25± 0,35	10,48± 0,02	1,23± 1,74	INDIFERENTE
	VAN	6,65± 0,21	6,78± 0,30	0,70± 0,48	INDIFERENTE
	AMI	0± 0	9,57± 0,09	50,36± 0,51	SINÉRGICO
	CIP	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	CPM	0± 0	12,29± 0,70	64,70± 3,68	SINÉRGICO
LFBM 23	GET	9 ± 0	9,15± 0,02	0,81± 0,11	INDIFERENTE
	IPM	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	RIF	13± 0	13,36± 0,19	1,92± 1	INDIFERENTE
	TGC	9,8± 0	10,35± 0,63	2,89± 3,35	INDIFERENTE
	VAN	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	AMI	0± 0	6,48 ± 0,02	34,13± 0,11	SINÉRGICO
	CIP	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	CPM	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
LFBM 25	GET	0 ± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	IPM	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	RIF	15,79 ± 0,29	16,8± 0	5,31± 1,56	INDIFERENTE
	TGC	10,57 ± 0,09	10,61± 0,04	0,23± 0,26	INDIFERENTE

	VAN	0± 0	6,71 ± 0,11	35,31± 0,59	SINÉRGICO
LFBM 26	AMI	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	CIP	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	CPM	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	GET	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	IPM	0± 0	0± 0	0± 0	INDIFERENTE
	RIF	15,73 ± 0,38	16,51± 0,01	5,31± 1,56	INDIFERENTE
	TGC	8,82 ± 0,16	9 ± 0	0,23± 0,26	INDIFERENTE
	VAN	0± 0	6,34 ± 0,06	35,31± 0,59	SINÉRGICO

AMI: Amicacina; CIP: Ciprofloxacina; CPM: Cloridrato de Cefepime; DP: Desvio Padrão; DZI: Diâmetro da Zona de Inibição; EPM: Erro Padrão da Média; GEN: Gentamicina; IPM: Imipenem; VAN: Vancomicina; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de microrganismos.

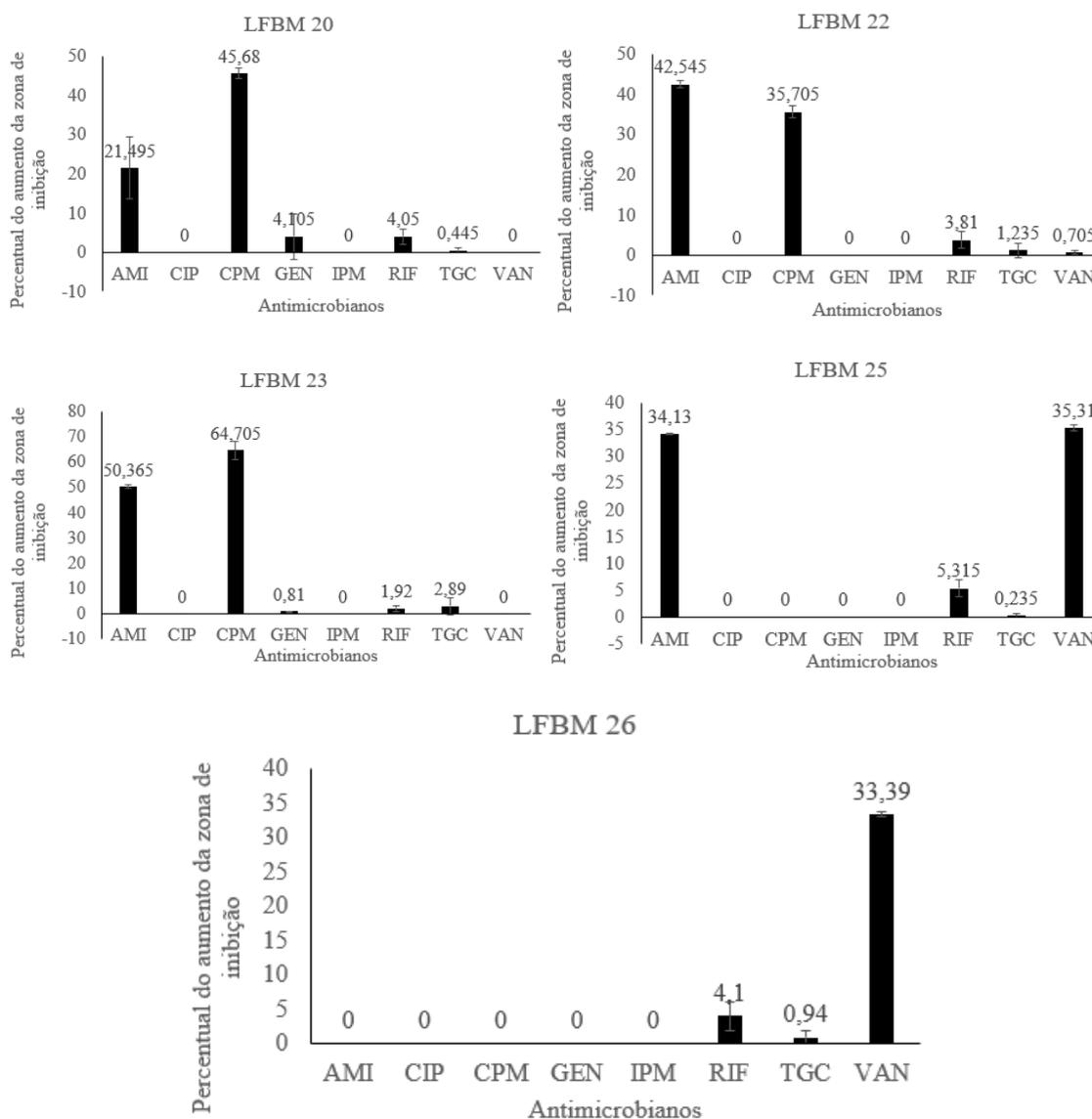
Figura 14: Percentual de aumento do Diâmetro da Zona de Inibição da associação beta-lapachona com oito antimicrobianos (amicacina, ciprofloxacino, cloridrato de cefepime, gentamicina, imipenem, rifampicina, tigeciclina e vancomicina) frente a *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* LFBM 03; LFBM 04, LFBM 05; LFBM 08.



Fonte: A autora (2022)

AMI: Amicacina; CIP: Ciprofloxacina; CPM: Cloridrato de Cefepime; GEN: Gentamicina; IPM: Imipenem; RIF: Rifamicina; TGC: Tigeciclina; VAN: Vancomicina; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de micro-organismos.

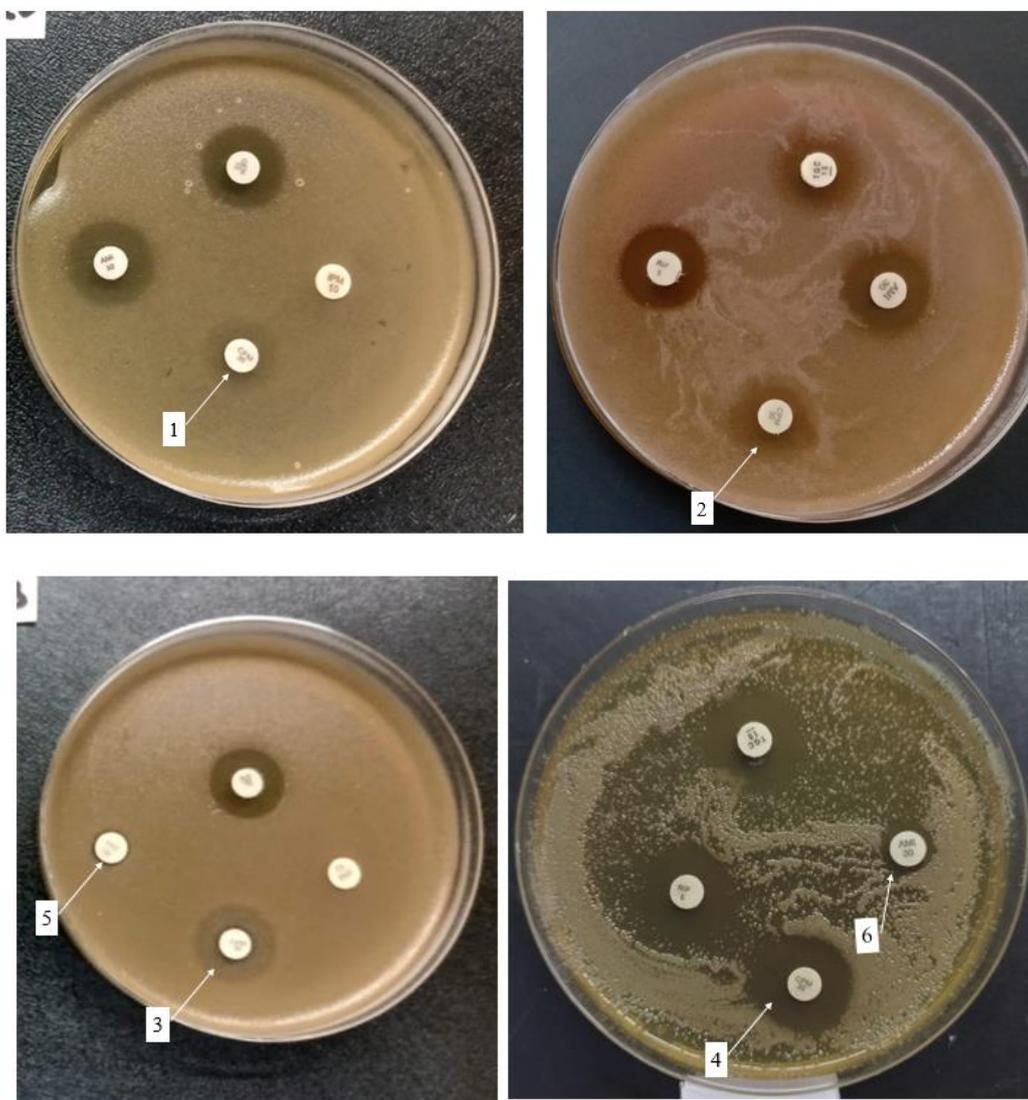
Figura 15: Percentual de aumento do Diâmetro da Zona de Inibição da associação beta-lapachona com oito antimicrobianos (amicacina, ciprofloxacino, cloridrato de cefepime, gentamicina, imipenem, rifampicina, tigeciclina e vancomicina) frente a cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (LFBM 20; LFBM 22, LFBM 23; LFBM 25, LFBM 26).



Fonte: A autora (2022)

AMI: Amicacina; CIP: Ciprofloxacina; CPM: Cloridrato de Cefepime; GEN: Gentamicina; IPM: Imipenem; RIF: Rifamicina; TGC: Tigeciclina; VAN: Vancomicina; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de micro-organismos.

Figura 16: Sinergismo representado na cepa LFBM 20 e LFBM 23 da associação beta-lapachona com cloridrato de cefepime e beta-lapachona com amicacina.



- 1- Halo de inibição do Cloridrato de Cefepime sem a presença da beta-lapachona(cepa LFBM 20)
- 2- Halo de inibição do Cloridrato de Cefepime em associação a beta-lapachona (cepa LFBM 20)
- 3- Halo de inibição do Cloridrato de Cefepime sem a presença da beta-lapachona (cepa LFBM 23)
- 4- Halo de inibição do Cloridrato de Cefepime com associação a beta-lapachona (cepa LFBM 23)
- 5- Halo de inibição da Amicacina sem a presença da beta-lapachona (cepa LFBM 23)
- 6- Halo de inibição da Amicacina em associação a beta-lapachona (cepa LFBM 23)

Fonte: A autora (2022)

## 6 DISCUSSÃO

O complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* é considerado um agente patogênico nosocomial oportunista que causa sérias e complicadas infecções em pacientes imunocomprometidos. Esse microrganismo vem sendo reportado como agente causador de meningite, septicemia, infecções em feridas de queimados, no trato respiratório, urinário e ósseas (MORRIS *et al.*, 2019). Essa alta significância clínica surgiu devido a sua intrínseca característica de apresentar resistência a vários antimicrobianos (LEE *et al.*, 2017).

Dessa forma, a busca por compostos isolados de metabólitos secundários de plantas tornou-se uma realidade para pesquisadores que investigam novas formas de tratamento para essas infecções.

A maioria das cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* mostraram um perfil de resistência para todos os antimicrobianos avaliados. Esses resultados corroboram aos de Pasetti e colaboradores (2022), que determinou o percentual de resistência de cepas *Acinetobacter baumannii* frente a diversos antimicrobianos a saber :Amicacina (94%), Meropenem (88%) e Cefepime (82%). Além disso, esse estudo também apontou a sensibilidade das cepas para polimixina B.

Nossos resultados também corroboram com um estudo feito em 2016 por Rolain, no qual, todas as cepas de *Acinetobacter baumannii* mostraram-se resistentes ao imipenem, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina, amicacina, gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprim e a maioria dos  $\beta$ -lactâmicos.

No presente estudo, foi analisado a capacidade da beta-lapachona em inibir o crescimento de cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. O potencial antimicrobiano de uma molécula bioativa foi classificado em 2004 por Sartoratto através da Concentração Inibitória Mínima do composto em estudo, de modo que: são considerados compostos com forte atividade a molécula que apresentar uma CIM entre 50 e 500 $\mu$ g/mL; atividade moderada quando for de 600 a 1500 $\mu$ g/mL; e fraca atividade quando acima de 1500 $\mu$ g/mL. Nesse estudo, a  $\beta$ -lapachona apresentou uma atividade de moderada para todas as cepas avaliadas, com CIM variando de 512 a 1024 $\mu$ g/mL.

Esses valores podem ser explicados devido ao mecanismo de ação da beta-lapachona que, quando em contato com macromoléculas intracelulares promove um estresse oxidativo através da formação de espécies reativas do oxigênio. Alguns desses

radicais formados são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical Hidroxila ( $HO\cdot$ ), gerando danos irreversíveis para a célula bacteriana, tais como: destruição de proteínas, peroxidação de lipídios e quebra do DNA. O metabolismo e divisão celular são bloqueados o que culmina com a ruptura celular (VESKOUKIS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2017).

A associação dessa naftoquinona, utilizada em concentração sub-inibitória (51,2 ou 3,2  $\mu\text{g/mL}$ ) à fármacos da classe dos aminoglicosídeos (amicacina), cefalosporinas (cefepime) e glicopeptídeos (vancomicina) gerou um efeito sinérgico, aumentando significativamente alguns halos de inibição de algumas cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

Dentre as dez cepas avaliadas, LFBM 04, LFBM 05, LFBM 20, LFBM 22, LFBM 23 e LFBM 25 a associação beta-lapachona/amicacina, apresentou um aumento no percentual da zona de inibição, superior a 19% caracterizando-a como sinérgica. Este efeito deve-se provavelmente a adição de dois mecanismos de ação distintos, pela indução do estresse oxidativo proveniente da beta-lapachona e a inibição da síntese protéica da amicacina.

Para as cepas ATCC 19606, LFBM 04, LFBM 08, LFBM 20, LFBM 22, e LFBM 23 a associação beta-lapachona/cefepime apresentaram-se sinérgicas. Esse sinergismo provavelmente deve-se a junção do mecanismo de ação redox da beta-lapachona com a inibição da síntese da parede celular ocasionado pelo cefepime.

A associação beta-lapachona-vancomicina mostrou-se sinérgica para as cepas LFBM 5, LFBM 25 e LFBM 26, esse aumento no halo de inibição pode ser proveniente a junção do mecanismo de ação da beta-lapachona, citado anteriormente, com o mecanismo de inibição da síntese da parede celular.

Macedo e colaboradores (2013) demonstrou uma atividade sinérgica na associação entre beta-lapachona-ciprofloxacino frente a cepas *S. aureus* metilicina resistente. Entretanto, nesse trabalho essa associação apresentou-se indiferente frente a cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* avaliadas. Esse efeito pode ser explicado com bases nas inúmeras formas de adquirir resistência do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*. O ciprofloxacino é pertencente ao grupo das fluoroquinonas, para o qual, as cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* apresentam aumento da expressão da bomba de efluxo. Além disso, outro mecanismo de resistência obtido por esses microrganismos são as mutações na topoisomerase I e II (LI *et al.*, 2005; MAHMOUDI *et al.*, 2020).

Portanto, a sinergia entre esses compostos ativos de origem natural e antimicrobianos torna-se pesquisa promissora, visto que, os esquemas terapêuticos para o complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* estão cada vez mais limitados devido a grande quantidade de cepas multidroga resistente.

## 7 CONCLUSÕES

A  $\beta$ -lapachona foi capaz de inibir o crescimento das cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* produtores de cabapenemases.

Todas as cepas analisadas nesse estudo mostraram-se sensíveis a polimixina B

A amicacina e cloridrato de cefepime foram os antimicrobianos que apresentaram efeito sinérgico com a beta-lapachona frente a maior parte das cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

A associação beta-lapachona-vancomicina foi sinérgica para as cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* LFBM 05, LFBM 25 e LFBM 26.

A associação beta-lapachona-imipenem, mostrou-se indiferente frente a todas as cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* avaliadas nesse estudo.

Esses resultados podem servir de base para estudos futuros de associações beta-lapachona com antimicrobiano contra cepas do complexo *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus*.

## 8 REFERÊNCIAS

ADAMS, Mark D. et al. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3628-3634, 2009.

DE ALMEIDA, Edvaldo Rodrigues et al. Antiinflammatory action of lapachol. **Journal of ethnopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 239-241, 1990.

DE PAIVA, Magna Cristina. Diversidade de bactérias, genes de resistência a Quinolonas e abundância do gene *int11* em uma estação de tratamento de esgoto revelada por abordagens de cultivo e metagenômica. 2015.

ANDRADE, Ferdinando F. et al. Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1716, 2020.

ARORA, D. S. Bhardwaj. 1997. Antibacterial activity of some medicinal plants. *Geo. Bios*, v. 24, p. 127-131.

ASAAD, Ahmed Morad et al. Epidemiology of biofilm producing *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolates from a tertiary care hospital in Egypt: a cross-sectional study. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 709, 2021.

AYOUB MOUBARECK, Carole; HAMMOUDI HALAT, Dalal. Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, p. 119, 2020.

BARIN, Juliana et al. Hetero-and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013.

BUTLER, David A. et al. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: resistance by any other name would still be hard to treat. **Current infectious disease reports**, v. 21, n. 12, p. 1-17, 2019.

BERENBAUM, M. C. A method for testing for synergy with any number of agents. **Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p. 122-130, 1978.

BOS, Julia; ZHANG, Qiucen; VYAWAHARE, Saurabh; ROGERS, Elizabeth; ROSENBERG, Susan M.; AUSTIN, Robert H. Emergence of antibiotic resistance from multinucleated bacterial filaments. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 112, n. 1, p. 178-183, 2014.

BRISOU, J.; PREVOT, A. R. ETUDES DE SYSTEMATIQUE BACTERIENNE. 10. REVISION DES ESPECES REUNIES DANS LE GENRE ACHROMOBACTER.

In: **Annales De L Institut Pasteur**. 21 STREET CAMILLE DESMOULINS, ISSY, 92789 MOULINEAUX CEDEX 9, FRANCE: MASSON EDITEUR, 1954. p. 722-728.

CHEN HD, GROISMAN EA. The biology of the PmrA/PmrB two-component system: the major regulator of lipopolysaccharide modifications. **Annu Rev Microbiol**, v.112, p. 67:83, 2013.

CHINWUBA, Z. G. et al. Determination of the synergy of antibiotic combinations by an overlay inoculum susceptibility disc method. **Arzneimittel-forschung**, v. 41, n. 2, p. 148-150, 1991.

CLARK, N. M.; ZHANEL, G. G. LYNCH, JP, 3RD 2016. Emergence of antimicrobial resistance among Acinetobacter species: a global threat. **Curr Opin Crit Care**, v. 22, p. 491-9.

CLAUSELL, Adrià et al. Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. **The journal of physical chemistry B**, v. 111, n. 3, p. 551-563, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th informational supplement. CLSI document M100-S29. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2019.

CRUZ, Vanessa S. et al.  $\beta$  Lapachone blocks the cell cycle and induces apoptosis in canine osteosarcoma cells. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 2224-2232, 2018.

SILVA, Milton N. da; FERREIRA, Vítor F.; DE SOUZA, Maria Cecília BV. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.

EVANS, B. E. et al. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. **Journal of medicinal chemistry**, v. 31, n. 12, p. 2235-2246, 1988.

EYONG, Kenneth O. et al. Conversion of lapachol to lomatiol: synthesis of novel naphthoquinone derivatives. **New Journal of Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 9611-9616, 2015.

FISHBAIN, Joel; PELEG, Anton Y. Treatment of Acinetobacter infections. **Clinical infectious diseases**, v. 51, n. 1, p. 79-84, 2010.

FOWLER VG, J. R. S. aureus Endocarditis and Bacteremia Study Group. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. **N Engl J Med.**, v. 355, p. 653-665, 2006..

GIAMMANCO, Anna et al. Global assessment of the activity of tigecycline against multidrug-resistant Gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. **Mosphere**, v. 2, n. 1, p. e00310-16, 2017.

GOGRY, Firdoos Ahmad et al. Current update on intrinsic and acquired colistin resistance mechanisms in bacteria. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2021.

GOLAN, David. Princípios de Farmacologia-A Base Fisiopatológica da Farmacologia, 3ª edição. **Grupo GEN**, p. 978-85, 2014.

HAMMERSTROM, Troy G. et al. *Acinetobacter baumannii* repeatedly evolves a hypermutator phenotype in response to tigecycline that effectively surveys evolutionary trajectories to resistance. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0140489, 2015.

HANCOCK, Robert EW. Peptide antibiotics. **The lancet**, v. 349, n. 9049, p. 418-422, 1997.

HAND, Elizabeth et al. Monotherapy with minocycline or trimethoprim/sulfamethoxazole for treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 4, p. 1071-1075, 2016.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, Marta et al. Presence of chromosomal *crpP*-like genes is not always associated with ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates recovered in ICU patients from Portugal and Spain. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 388, 2021.

HUSSAIN, Hidayat et al. Lapachol: an overview. **Arkivoc**, v. 2, n. 1, p. 145-171, 2007.

JENNER, Lasse et al. Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 10, p. 3812-3816, 2013.

KARAKONSTANTIS, Stamatis; KRITSOTAKIS, Evangelos I.; GIKAS, Achilleas. Treatment options for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems, aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems. **Infection**, v. 48, n. 6, p. 835-851, 2020.

KALIL, Andre C. et al. Executive summary: management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 5, p. 575-582, 2016.

KLAUS, Viola et al. 1, 4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 496, n. 2, p. 93-100, 2010.

LAISHRAM, Shakti et al. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 445-468, 2017.

LEE, C-R.; LEE, J.H.; PARK, M.; PARK, K.S.; BAE, I.K.; KIM, Y.B.; CHA, C-J.; JEONG, B.C.; LEE, S.H. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. **Front Cell Infect Microbiol**, Coréia do Sul, v. 7, p. 1–35, 2017.

LI, Xian-Zhi. Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 6, p. 453-463, 2005.

LIRA, Ana Amélia M. et al. Development of lapachol topical formulation: anti-inflammatory study of a selected formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 163-168, 2008.

LOPES, Wilson A.; ANDRADE, JB de. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 497-516, 1996.

LYNCH, J.P.; ZHANEL, G.G.; CLARK, N.M. Infections Due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU: Treatment Options. **Semin Respir Crit Care Med**, Califórnia, v. 38, p.311–325, 2017

MACEDO, L. et al.  $\beta$ -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, v. 21, n. 1, p. 25-29, 2013.

MEREDITH, Jeffrey J.; DUFOUR, Antoine; BRUCH, Martha D. Comparison of the structure and dynamics of the antibiotic peptide polymyxin B and the inactive nonapeptide in aqueous trifluoroethanol by NMR spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 2, p. 544-551, 2009.

MAHMOUDI, Hassan et al. Detection of *adeABC* efflux pump encoding genes and antimicrobial effect of *Mentha longifolia* and Menthol on MICs of imipenem and ciprofloxacin in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **BMC complementary medicine and therapies**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2020.

MORRIS, F. C. et al. **The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii***. **Front Microbiol.** 2019; 10: 1601. Epub 2019/08/06. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01601> PMID: 31379771, 2019.

MUGNIER, P. et al. Carbapenem-resistant and OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in the United Arab Emirates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 9, p. 879-882, 2008.

NASR, P. Genetics, epidemiology, and clinical manifestations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Hospital Infection**, v. 104, n. 1, p. 4-11, 2020.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2022). **PubChem** Compound Summary for CID 10667, 1,2-Naphthoquinone. Retrieved August 14, 2022. Disponível em: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1\\_2-Naphthoquinone](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_2-Naphthoquinone) Acesso em: 20 jul. 2022.

NOGUEIRA, Leonardo Gorla. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori*. 2012.

NWORU, C. S.; ESIMONE, C. O. Comparative evaluation of three in vitro techniques in the interaction of ampicillin and ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 2, p. 605-611, 2006.

O'DONNELL, J. Nicholas; PUTRA, Vibert; LODISE, Thomas P. Treatment of patients with serious infections due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: How viable are the current options?. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 41, n. 9, p. 762-780, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812). Acesso em: 11 set. 2020.

OJKIC, Nikola et al. A roadblock-and-kill mechanism of action model for the DNA-targeting antibiotic ciprofloxacin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 9, p. e02487-19, 2020.

OUYANG, Lichen; GONG, Jie. Mitochondrial-targeted ubiquinone: A potential treatment for COVID-19. **Medical hypotheses**, v. 144, p. 110161, 2020.

PAPP-WALLACE, K. M.; ENDIMIANI, A. taracila MA, Bonomo rA. **Carbapenems: past, present, and future**. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 4943-60, 2011.

PAIS GM, CHANG J, BARRETO EF, STITT G, DOWNES KJ, ALSHAER MH, LESNICKI E, PANCHAL V, BRUZZONE M, BUMANGLAG AV, BURKE SN, SCHEETZ MH. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cefepime. **Clin Pharmacokinet**. v. 61 p. 929-953, 2022.

PASETTI, Emanuelle Sad et al. ETIOLOGIA E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS, DAS PNEUMONIAS ASSOCIADAS À VENTILAÇÃO MECÂNICA (PAV), DURANTE A PANDEMIA DE COVID-19, EM HOSPITAL DO GRANDE ABC PAULISTA. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 102093, 2022.

PELEG, Anton Y.; ADAMS, Jennifer; PATERSON, David L. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2065-2069, 2007.

PEYROU, Mathieu; HANNA, Paul E.; CRIBB, Alastair E. Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys. **Toxicological Sciences**, v. 99, n. 1, p. 346-353, 2007.

PROKHOROVA, Irina et al. Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 51, p. E10899-E10908, 2017.

RAMIREZ, Maria Soledad; BONOMO, Robert A.; TOLMASKY, Marcelo E. Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a yet more dangerous menace. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 720, 2020.

RAMIREZ, Maria S.; TOLMASKY, Marcelo E. Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2267, 2017.

RAVICHANDIRAN, Palanisamy et al. Synthesis and antimicrobial evaluation of 1, 4-naphthoquinone derivatives as potential antibacterial agents. **ChemistryOpen**, v. 8, n. 5, p. 589-600, 2019.

REGO, E. Hesper; AUDETTE, Rebecca E.; RUBIN, Eric J. Deletion of a mycobacterial divisome factor collapses single-cell phenotypic heterogeneity. **Nature**, v. 546, n. 7656, p. 153-157, 2017.

NETTELNBREKER, E. et al. Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacillixs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 1-3, 1997.

ROSSAU, R. et al. Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 310-319, 1991.

ROLAIN, J.-M. et al. Emergence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 Carbapenemase in Qatar. **New Microbes and New Infections**, v. 11, p. 47-51, 2016.

RUANGPAN, Lila; TENDENCIA, Eleonor. **Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment**. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center., 2004.

SAHL, Jason W. et al. Genomic comparison of multi-drug resistant invasive and colonizing *Acinetobacter baumannii* isolated from diverse human body sites reveals genomic plasticity. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2011.

SANTANA C. F.; DE LIMA O. G.; D'ALBUQUERQUE I. L.; LACERDA A. L.; MARTINS D. G.; Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do líber e de alguns componentes do cerne do Pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*). **Rev. Inst. Antibiot.**, v.8 (1/2), p.89–94,1968.

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

SERIO, Alisa W. et al. Aminoglycosides: Mechanisms of action and resistance. In: **Antimicrobial drug resistance**. Springer, Cham, 2017. p. 213-229. SILVA, A. M. P.; PAIVA, S. R.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Atividade biológica de naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae. **Rev Fitos**. 2012;7(4):207-15.

SILVA, M. N. et al. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, v. 3, p. 407-416, 2003

SKIADA, A. et al. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Antimicrob Agents**, v.37, n.3, p.187–193, 2011.

SOUSA, E. T. et al. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Quim. Nova**. 39 (4): 486-495, 2016.

STEIN, Gary E.; BABINCHAK, Timothy. Tigecycline: an update. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 75, n. 4, p. 331-336, 2013.

TAHARA, T.; WATANABE, A.; YUTANI, M.; YAMANO, Y.; SAGARA, M.; NAGAI, S.; SAITO, K.; YAMASHITA, M.; IHARA, M.; IIDA, A. STAT3 inhibitory activity of naphthoquinones isolated from *Tabebuia avellanedae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 28, p. 115347, 2020.

TANDON, V. K.; KUMAR, S. Recent development on naphthoquinone derivatives and their therapeutic applications as anticancer agents. **Expert Opin Ther Pat**. v 23(9):1087-108. 2013.

TAPLITZ, Randy A. et al. Outpatient management of fever and neutropenia in adults treated for malignancy: American Society of Clinical Oncology and Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline Update. **J Clin Oncol**, v. 36, n. 14, p. 1443-1453, 2018.

TARASHI, Samira; SIADAT, Seyed Davar; FATEH, Abolfazl. Nontuberculous Mycobacterial Resistance to Antibiotics and Disinfectants: Challenges Still Ahead. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022.

TEIXEIRA, Maria Jania et al. In vitro and in vivo Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1, 4-naphthoquinone (lapachol). **Phytotherapy**

**Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 15, n. 1, p. 44-48, 2001.

THOMAS, Varsha M. et al. Synergistic effect between nisin and polymyxin B against pandrug-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 53, n. 5, p. 663-668, 2019.

THOMSON, R. H.; Quinonas de ocorrência natural IV. **Springer: Holanda**, 1996.

TOOSKY, Melody; JAVID, Babak. Novel diagnostics and therapeutics for drug-resistant tuberculosis. **British medical bulletin**, v. 110, n. 1, 2014.

UEDA, S. *Tabebuia avellaneda* Lorentz ex Griseb. (Taheebo): In Vitro Culture and the Production of Naphthoquinones. In: **Medicinal and Aromatic Plants VII**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1994. p. 445-456.

VÁZQUEZ-LÓPEZ, Rosalino et al. *Acinetobacter baumannii* resistance: a real challenge for clinicians. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, p. 205, 2020.

VELOSO, Jéssica O. et al. Methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* colonizing patients and intensive care unit environment: virulence profile and genetic variability. **Apmis**, v. 127, n. 11, p. 717-726, 2019.

VELKOV, Tony et al. Structure– activity relationships of polymyxin antibiotics. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1898-1916, 2010.

VENTURA PINTO, Antônio; LISBOA DE CASTRO, Solange. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules**, v. 14, n. 11, p. 4570-4590, 2009.

VESKOUKIS, Aristidis S.; TSATSAKIS, Aristidis M.; KOURETAS, Dimitrios. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. **Cell Stress and Chaperones**, v. 17, n. 1, p. 11-21, 2012.

WELLINGTON, Kevin W. et al. Anticancer activity, apoptosis and a structure–activity analysis of a series of 1, 4-naphthoquinone-2, 3-bis-sulfides. **Investigational New Drugs**, v. 38, n. 2, p. 274-286, 2020.

WICKENS, H. J. et al. Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency, and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 682-687, 2000.

WILLIAMS, Llewelyn; DAHLGREN, Bror Eric. *Woods of northeastern Peru*. 1936

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new

antibiotics WHO – **World Health Organization** (2018). WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption

WONG, Darren et al. Clinical and pathophysiological overview of Acinetobacter infections: a century of challenges. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 409-447, 2017.

YADAV, A.N.; KOUR, D.; RANA, K.L.; YADAV, N.; SINGH, B.; CHAUHAN, V.S., et al. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. **Elsevier**; **2019**. pp. 279–320 WHO – World Health Organization (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance.

YANG, Cheng-Hong et al. Biofilm formation in Acinetobacter Baumannii: genotype-phenotype correlation. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1849, 2019.

YAO, Nian-Huan et al. Conformational studies of resin-bound vancomycin and the complex of vancomycin and Ac<sup>2</sup>-L-Lys-D-Ala-D-Ala. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 123-129, 2005.

YUN, B. et al. Polymyxin B causes DNA damage in HK-2 cells and mice. **Archives of toxicology**, v. 92, n. 7, p. 2259-2271, 2018.

ZHANG, Xia et al. Antibacterial meroterpenoids from the South China Sea sponge Dysidea sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, p. c16-00183, 2016.