

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**GERALDO DA SILVA ALVES**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DA PAEPALANTINA  
ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS  
EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

VITÓRIA  
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

---

"Avaliação *in vitro* da Atividade da Paepalantina Isoladamente e em Associação com Antibacterianos em Bactérias Multirresistentes"

Geraldo da Silva Alves

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck (UFES)  
Orientador

Prof.ª Dr.ª Greiciane Gaburro Paneto (UFES)  
Membro Interno

Prof. Dr. André Luiz Souza dos Santos (UFRJ)  
Membro Externo

Vitória-ES, 24 de Novembro de 2016.

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

A474a Alves, Geraldo da Silva, 1967 -  
Avaliação in vitro da atividade da paepalantina isoladamente  
e em associação com antimicrobianos em bactérias  
multirresistentes / Geraldo da Silva Alves – 2016.  
83 f. : il.

Orientador: Ricardo Pinto Schuenck.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Anti-Infeciosos. 2. Sinergismo Farmacológico.  
I. Schuenck, Ricardo Pinto. II. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

**GERALDO DA SILVA ALVES**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DA PAEPALANTINA  
ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS  
EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck

VITÓRIA  
2016

**GERALDO DA SILVA ALVES**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DA PAEPALANTINA  
ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS  
EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 24 de novembro de 2016.

---

**Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos**  
Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ  
Membro Externo

---

**Profa. Dra. Greiciane Gaburro Paneto**  
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo - UFES  
Membro Interno

---

**Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck**  
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo - UFES  
Orientador

VITÓRIA

2016

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo P. Schuenck pela oportunidade, amizade e aprendizado científico.

Ao professor Dr. Rodrigo Kitagawa pela colaboração.

Aos alunos e servidores do LabCAS, Resbac, LabViG e LUCCAR pela valiosa contribuição.

Ao amigo André Luiz Teixeira, pela colaboração na edição das figuras.

Aos amigos do Laboratório Central Municipal-PMV pela colaboração.

Aos funcionários do Departamento de Patologia - UFES, pela gentileza e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do HUCAM.

Às professoras Ana Paula F. Nunes e Liliana C. Spano por terem cedido diversas vezes a estrutura física e os equipamentos necessários para a realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade.

A CAPES, FAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

## RESUMO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é uma ameaça global à saúde pública. O uso de produtos naturais derivados de plantas que tem atividade antimicrobiana em associação com antibacterianos tradicionais podem ser alternativas viáveis para a produção de novos fármacos eficazes contra micro-organismos multirresistentes. A isocumarina paepalantina e o dímero de paepalantina, isolados dos capítulos de *Paepalanthus bromelioides*, têm se destacado como substâncias promissoras em função de seu potencial biológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da paepalantina e do dímero isoladamente e em associação, através do método de *checkerboard*, com diferentes antimicrobianos de uso clínico (vancomicina, oxacilina e meropenem) em amostras de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes e avaliar por microscopia eletrônica de varredura possíveis alterações morfológicas em amostras expostas a concentrações inibitórias e subinibitórias de paepalantina e do dímero isoladamente e em associação com antibacterianos. Nas amostras de *E. faecium*, a paepalantina e o dímero isoladamente apresentaram concentração mínima inibitória (CMI) de 32 µg/mL. A associação com a vancomicina não apresentou aumento na atividade desse fármaco. Para *S. aureus*, a paepalantina e o dímero apresentam bom potencial inibitório quando testados isoladamente (CMI 16 e 8 µg/mL, respectivamente). A associação da paepalantina com a oxacilina mostrou-se indiferente em três das cinco amostras analisadas, enquanto que a associação do dímero com esse fármaco mostrou-se sinérgica em todas as amostras, com redução de até 256 vezes na CMI. Em relação aos micro-organismos Gram-negativos, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, a paepalantina e o dímero apresentaram fraco potencial inibitório (CMI > 256 µg/mL) e a associação com meropenem não apresentou aumento na atividade desses. O presente estudo demonstrou a atividade das isocumarinas paepalantina e do dímero apenas em bactérias Gram-positivas (*E. faecium* e *S. aureus*). A combinação dessas substâncias, sobretudo do dímero, com a oxacilina apresentou efeito sinérgico relevante, o que propicia perspectiva de estudos adicionais para o desenvolvimento de produtos com a associação destas substâncias. Em *S. aureus*, após análise por MEV, verificou-se que as substâncias

não atuam alterando a estrutura externa desse micro-organismo nas condições utilizadas neste estudo.

**Palavras-chave:** Resistência bacteriana; Paepalantina; Sinergismo.



## ABSTRACT

Bacterial resistance is a global threat to public health. The use of plant-derived products with antimicrobial activity in association with traditional antibacterial drugs may be viable alternatives to the production of effective new drugs against multiresistant microorganisms. Isocoumarin paepalantine (PA) and paepalantine dimer (PAD) isolated from the capitula of *P. bromelioides*, have stood out as a promising substance because of their biological potential. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of PA and PAD alone and in association with different antimicrobials (vancomycin, oxacillin and meropenem) in multiresistant strains of *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* and to evaluate by scanning electron microscopy possible morphological changes in strains exposed to inhibitory and subinhibitory concentrations of paepalantine and dimer alone and in association with antibacterial agents. In all *E. faecium* strains, PA and PAD alone presented a minimal inhibitory concentration (MIC) of 32 µg/mL. The association with vancomycin did not show an increase in the activity of this drug. For *S. aureus*, PA and PAD had good inhibitory potential when tested alone (MIC 16 and 8 µg/mL, respectively). The association between PA and oxacillin was indifferent in three of the five strains analyzed, while the association of the PAD with this drug was synergistic in all of them, with a reduction of up to 256 times in MIC. In Gram-negative microorganisms, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, PA and PAD presented weak inhibitory potential (MIC > 256 µg/mL) and the association with meropenem did not show an increase in their activity. The present study demonstrated activity of PA and PAD only in Gram-positive bacteria (*E. faecium* and *S. aureus*). The association of these isocoumarin, especially PAD, with oxacillin presented a relevant synergistic effect, which provides perspective to additional studies for development of products with association of these substances. In *S. aureus*, after SEM analysis, it was verified that the substances do not act altering the external structure of this microorganism under the conditions used in this study.

**Key-words:** Bacterial-resistance; Paepalantine; Synergism.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Problemas associados aos micro-organismos multirresistentes (MDR), extensamente resistentes (XDR) e pan-resistentes (PDR).....	5
<b>Figura 2:</b> Consumo mundial de antibacterianos .....	6
<b>Figura 3:</b> Número de novos antibacterianos aprovados para uso humano entre 1980 e 2012.....	6
<b>Figura 4:</b> Introdução de novos fármacos na prática clínica e o desenvolvimento da resistência bacteriana .....	7
<b>Figura 5:</b> Principais alvos dos antibacterianos .....	8
<b>Figura 6:</b> Principais mecanismos de resistência das bactérias aos antibacterianos .....	9
<b>Figura 7:</b> Distribuição dos micro-organismos notificados como agentes etiológicos de infecções de corrente sanguínea relacionada a uso de cateter venoso em pacientes adultos hospitalizados em UTIs em 2014.....	10
<b>Figura 8.</b> Taxas de resistência à meticilina em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de infecções primárias de corrente sanguínea por região geográfica em pacientes em terapia intensiva durante o período de 2006 a 2008 .....	14
<b>Figura 9:</b> Distribuição geográfica mundial de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase tipo KPC.....	19
<b>Figura 10:</b> Distribuição geográfica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos.....	21
<b>Figura 11:</b> Epidemiologia global da resistência aos carbapenêmicos em <i>Acinetobacter</i> .....	22
<b>Figura 12:</b> <i>Paepalanthus bromelioides</i> .....	27
<b>Figura 13:</b> Estrutura química da paepalantina.....	28
<b>Figura 14:</b> Estrutura química do dímero 8,8'-paepalantina.....	28
<b>Figura 15:</b> Fluxograma do processo de seleção das amostras.....	31
<b>Figura 16:</b> Representação da metodologia do ensaio de associação entre substâncias pela técnica de <i>checkerboard</i> .....	35
<b>Figura 17:</b> Representação do método de checkerboard, demonstrando a associação entre dímero e a oxacilina em uma amostra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina.....	37

<b>Figura 18:</b> Inibição do crescimento de <i>Enterococcus faecium</i> frente a paepalantina nas concentrações de 128 a 1,0 µg/mL.....	39
<b>Figura 19:</b> Inibição do crescimento de <i>Enterococcus faecium</i> frente a dímero nas concentrações de 64 a 0,25 µg/mL.....	40
<b>Figura 20:</b> Inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a paepalantina nas concentrações de 64 a 1,0 µg/mL.....	40
<b>Figura 21:</b> Inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a dímero nas concentrações de 128 a 0,0625 µg/mL.....	41
<b>Figura 22:</b> Inibição do crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> frente a paepalantina nas concentrações de 256 a 4,0 µg/mL.....	41
<b>Figura 23:</b> Inibição do crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> frente a dímero nas concentrações de 256 a 4,0 µg/mL.....	42
<b>Figura 24:</b> Inibição do crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a paepalantina nas concentrações de 256 a 4,0 µg/mL.....	42
<b>Figura 25:</b> Inibição do crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a dímero nas concentrações de 256 a 4,0 µg/mL.....	43
<b>Figura 26:</b> Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia do <i>Staphylococcus aureus</i> .....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> O "Alfabeto Van": fenótipos e genótipos de <i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina.....	12
<b>Tabela 2:</b> Classificação das beta-lactamases.....	17
<b>Tabela 3:</b> Detalhes dos novos antibacterianos aprovados pela FDA entre os anos de 2010-2015.....	24
<b>Tabela 4:</b> Características fenotípicas e genotípicas das amostras utilizadas neste estudo.....	32
<b>Tabela 5:</b> Padrões interpretativos para determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	34
<b>Tabela 6:</b> Antibacterianos utilizados nos ensaios de <i>checkerboard</i> .....	35
<b>Tabela 7:</b> Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos antibacterianos, paepalantina e dímero.....	43
<b>Tabela 8:</b> Resultados da associação <i>in vitro</i> entre vancomicina/paepalantina e vancomicina/dímero nas amostras de <i>Enterococcus faecium</i> .....	44
<b>Tabela 9:</b> Resultados da associação <i>in vitro</i> entre oxacilina/paepalantina e oxacilina/dímero para <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
<b>Tabela 10:</b> Resultado da associação <i>in vitro</i> entre meropenem/paepalantina e meropenem/dímero frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	46
<b>Tabela 11:</b> Resultado da associação <i>in vitro</i> entre meropenem/paepalantina e meropenem/dímero nas amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AmpC - Ampicilinase C

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - Coleção Norte Americana de Micro-organismos (do inglês: *American Type Culture Collection*)

CA-MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina adquiridos na comunidade (do inglês *community-acquired MRSA*)

CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês: *Centers for Disease Control and Prevention*)

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CIF - concentração inibitória fracional

CLSI - Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (do inglês: *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CMI - concentração mínima inibitória

DNA - ácido desoxirribonucléico

ESBL – Beta-lactamases de espectro ampliado (do inglês: Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase)

FDA - Agência americana de medicamentos e alimentos (do inglês: *Food and Drug Administration*)

HA-MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina associados aos cuidados de saúde (do inglês: *hospital-acquired MRSA*)

IDSA - Sociedade de doenças infecciosas da América (do inglês: *Infectious Diseases Society of America*)

ICIF - índice da concentração inibitória fracional

IPCS - infecção primária da corrente sanguínea

LabCAS - Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana Clésio Azevedo Schuenck

MDR - resistente à múltiplas drogas (do inglês: multidrug resistant)

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (do inglês: *methicillin - resistant Staphylococcus aureus*)

OMS/WHO - Organização Mundial da Saúde (do inglês: *World Health Organization*)

- PCAST - Conselho de Consultores da Presidência em Ciência e Tecnologia (do inglês: *President's Council of Advisors on Science and Technology*)
- PCR - reação em cadeia da polimerase (do inglês: *polymerase chain reaction*)
- PDR – pan-droga resistente (do inglês: *pandrug-resistant*)
- PFGE - eletroferese em campo pulsado (do inglês: *pulsed field gel electrophoresis*)
- PVL - leucocidina de Pantón-Valentine
- Rede RM - Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços da Saúde
- RNA - ácido ribonucléico
- SCC*mec* - cassete cromossômico estafilocócico *mec*
- SCN - *Staphylococcus* coagulase-negativa
- UFC - Unidades formadoras de colônias
- UFES - Universidade Federal do Espírito Santo
- UTI - Unidade de terapia intensiva
- VISA - *Staphylococcus aureus* de resistência intermediária à vancomicina (do inglês: *vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*)
- VRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (do inglês: *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*)
- VRE – *Enterococcus* resistente à vancomicina (do inglês: *vancomycin resistant Enterococcus*)
- XDR – extensivamente resistente as drogas (do inglês: *extensively drug-resistant*)

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - por cento

° - graus

°C – graus Celsius

g - força gravitacional

h – horas

µg/mL – micrograma por mililitro

µL – microlitro

µm – micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Resistência bacteriana .....	4
2.2 Principais bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar.....	9
2.2.1 Principais bactérias Gram-positivas multirresistentes.....	11
2.2.2 Principais bactérias Gram-negativas multirresistentes.....	16
2.3 Novas alternativas para tratamento de bactérias multirresistentes.....	23
2.3.1 Novos antibacterianos aprovados.....	23
2.3.2 Produtos naturais.....	25
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 Aspectos éticos.....	30
4.2 Amostras bacterianas.....	30
4.3 Obtenção da paepalantina e do dímero.....	32
4.4 Determinação da concentração mínima inibitória pela técnica de microdiluição em caldo.....	33
4.4.1 Controle de qualidade.....	34
4.5 Avaliação da atividade da associação paepalantina/dímero com os agentes antibacterianos pelo método de <i>checkerboard</i> .....	34
4.6 Avaliações da morfologia bacteriana por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	38
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
5.1 Atividade da paepalantina e dímero no crescimento bacteriano.....	39
5.2 Análise da atividade da associação entre paepalantina e o dímero com os antibacterianos.....	44
5.3 Avaliação da estrutura bacteriana por microscopia eletrônica de varredura em <i>Staphylococcus aureus</i> .....	47
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>



## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Ao longo dos anos, em todo o mundo, a presença de bactérias multirresistentes em ambientes hospitalares tem aumentado consideravelmente, causando infecção, principalmente, em pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva. Tais infecções representam um importante problema de saúde pública, não só em termos de morbi-mortalidade, mas também vem acarretando custos médicos significativamente elevados, aumento no tempo de hospitalização, com consequente diminuição na disponibilidade de leitos, além de favorecer a seleção e disseminação de micro-organismos multirresistentes (GISKE *et al.*, 2008; HOGBERG; NATHWANI, 2009; HEDDINI; CARS, 2010). Em muitos casos, monoterapias são comumente ineficazes frente a organismos multirresistentes e muitos tratamentos utilizam terapias associadas com o objetivo de melhorar os resultados clínicos, aumentando ainda mais o uso de antibacterianos no ambiente hospitalar (TRAUGOTT *et al.*, 2011; TAMMA; COSGROVE; MARAGAKIS, 2012).

O motor de condução do processo de multirresistência é a pressão seletiva que ocorre com o uso em larga escala de antibacterianos nos hospitais e também na agropecuária. A resistência a diversas classes de antibacterianos utilizados atualmente atinge tanto bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp, etc) quanto bactérias Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc). Essa situação ameaçadora apela urgentemente a um esforço internacional concentrado entre governos, a indústria farmacêutica, empresas de biotecnologia e o mundo acadêmico para apoiar o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Um exemplo de tal esforço foi dado pela *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) que promoveu um desafio à comunidade científica para o desenvolvimento 10 novos antibacterianos de uso sistêmico, com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, até 2020 (FEDORENKO *et al.*, 2015). Outro retrato deste esforço foi que em novembro de 2013 o Presidente dos Estados Unidos da América, Barack Obama, incumbiu o Conselho de Consultores da Presidência em Ciência e Tecnologia (PCAST) de realizar recomendações práticas e factíveis sobre a melhor maneira de conter o aumento da resistência bacteriana. Neste relatório, o PCAST recomenda um conjunto de medidas focando em três áreas: i) melhoria da vigilância em relação às bactérias resistentes para permitir uma resposta eficaz e controlar surtos; ii)

prolongar a utilização dos antibacterianos atuais, promovendo o uso adequado dos mesmos; iii) acelerar o desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos (PCAST, 2014).

Em consonância com a resolução da Organização Mundial da Saúde para a promoção do uso racional de antimicrobianos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou, em outubro de 2010, medidas regulatórias com o objetivo de reduzir a exposição da população aos antimicrobianos. A RDC nº 20/2011 estabeleceu que todas as farmácias devem apenas dispensar antimicrobianos mediante apresentação e retenção de receita médica. Com a Instrução Normativa nº 01 de 14 de janeiro de 2013, a ANVISA passou a exigir que as farmácias e drogarias informem, eletronicamente, a venda de medicamentos e substâncias contendo antimicrobianos no Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC) (ANVISA, 2013).

Ainda sobre esse tema, a ANVISA publicou a Nota Técnica 01/2013 que trata de “Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes”. O documento é abrangente e aborda desde recomendações relacionadas à assistência ao paciente colonizado/infectado, até as práticas do laboratório de microbiologia específicas para detecção de carbapenemases nas diversas bactérias deste grupo. Em 2015, foi divulgada a Nota Técnica 02/2015 que trata das “Orientações gerais para a implantação da sub-rede analítica de resistência microbiana em serviços de saúde”. Seu objetivo geral é subsidiar ações de vigilância e monitoramento da resistência microbiana em serviços de saúde, por meio da identificação e tipagem molecular de micro-organismos multirresistentes em situações de surtos (ANVISA, 2015).

O número de novos antibacterianos desenvolvidos e aprovados diminuiu de forma constante nas últimas décadas, restringindo as opções para tratamento de bactérias multirresistentes (HOGBERG; HEDDINI; CARS, 2010). Entre os anos de 2010 e 2015, apenas oito novos antibacterianos foram aprovados para uso humano pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, porém, a maioria desses fármacos foi aprovada para a mesma indicação e apenas um constitui uma nova classe de antibacteriano (DEAK *et al.*, 2016).

O uso de produtos naturais derivados de plantas que tem atividade antimicrobiana em associação com antibacterianos tradicionais podem ser

alternativas viáveis para a produção de novos fármacos eficazes contra micro-organismos multirresistentes. De acordo com trabalhos já realizados com algumas espécies da família *Eriocaulaceae*, como *P. bromelioides*, as principais classes de constituintes químicos isolados dessas plantas são: flavonóides, isocumarinas, esteróides, entre outras (MOREIRA *et al.*, 2002). A isocumarina paepalantina, isolada dos capítulos de *P. bromelioides* tem se destacado como uma substância promissora em função de seu potencial biológico. Estudos anteriores demonstraram atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antioxidante, citotóxica, entre outras. A respeito da atividade antibacteriana, a paepalantina demonstrou significativa atividade contra bactérias Gram-positivas abrindo novas possibilidades de avaliação sobre esses e outros micro-organismos (DEVIENE *et al.*, 2005).

Nesse contexto, o Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana (LabCAS), onde foi desenvolvido o presente trabalho, participa, dentro outros, de projetos envolvendo prospecção de substâncias naturais e sintéticas que apresentem atividade antimicrobiana em bactérias hospitalares. Assim, nesse estudo, realizado em parceria com o Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais, vinculado ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - UFES, nos propusemos a analisar a interação entre bactérias multirresistentes com paepalantina e seu dímero isoladamente e o possível sinergismo dessas substâncias com antibacterianos já utilizados na rotina médica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

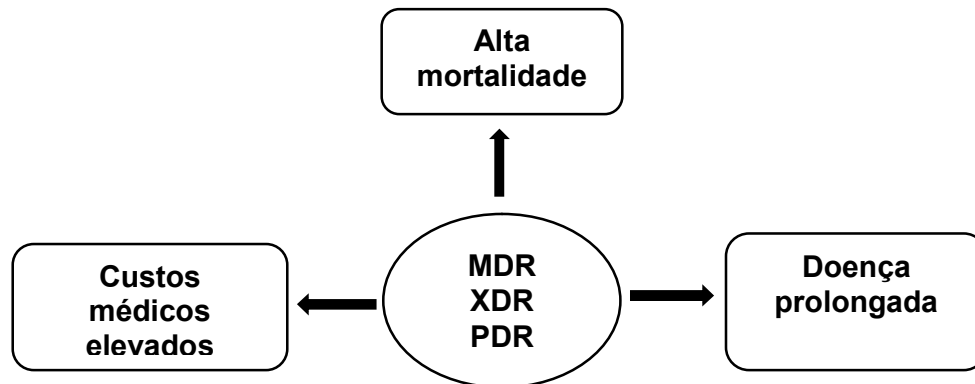
### 2.1 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana refere-se à capacidade das bactérias multiplicarem-se na presença de concentrações de antibacterianos mais altas do que as que provêm de doses ministradas em pacientes (WANNMACHER, 2012). Esse processo constitui uma ameaça crescente para a saúde pública mundial e requer a adoção de medidas por parte de todos os setores governamentais e da sociedade em geral (OMS, 2014).

Em 2011, um grupo de especialistas internacionais reuniu-se para criar uma terminologia internacional padronizada para descrever os perfis de resistência adquiridos em bactérias frequentemente responsáveis por infecções hospitalares e propensas à multirresistência. As descrições propostas foram: MDR (*multidrug-resistant*) – os micro-organismos multirresistentes são definidos como aqueles resistentes a pelo menos um agente de três ou mais classes de antibacterianos distintas; XDR (*extensively drug-resistant*) – os micro-organismos extensamente resistentes são aqueles susceptíveis a pelo menos uma ou duas categorias de antibacterianos; PDR (*pandrug-resistant*) – os pan-resistentes são considerados aqueles com resistência comprovada *in vitro* a todos os antimicrobianos de todas as categorias existentes (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

Infecções por micro-organismos classificados como MDR, XDR e PDR acarretam custos médicos significativamente elevados, incluindo necessidade de uso de fármacos mais custosos e estadias mais longas em hospitais (Figura 1). Além disso, promove o aumento no tempo de tratamento e da morbi-mortalidade dos pacientes (GISKE *et al.*, 2008; NATHWANI, 2009; HÖGBERG *et al.*, 2010).

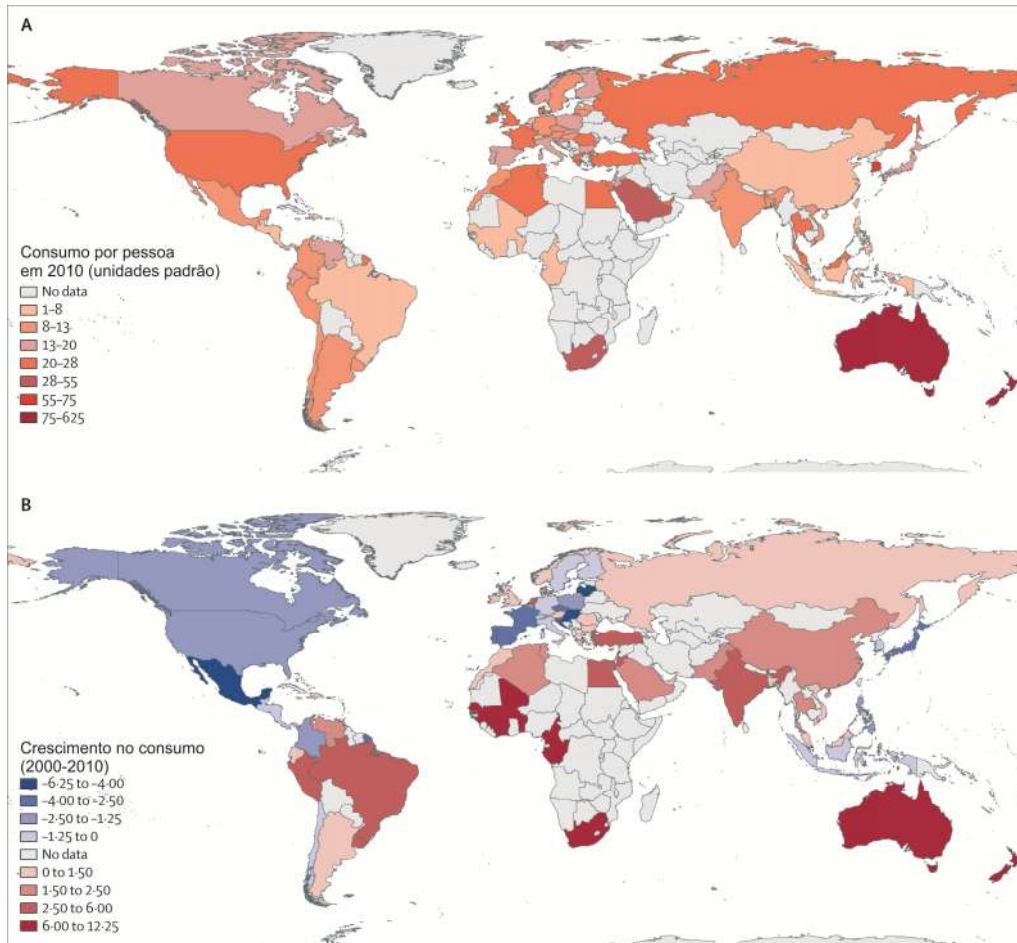
A evolução de estirpes resistentes é um fenômeno natural que ocorre quando os micro-organismos replicam-se erroneamente ou quando genes de resistência são trocados entre eles. No entanto, o aumento no uso de antibacterianos, o qual por muitas vezes ocorre de forma inapropriada, acelera o aparecimento de estirpes resistentes. Além disso, práticas inadequadas de controle de infecção, condições sanitárias e manuseio alimentar inadequados incentivam à generalização da resistência antimicrobiana (OMS, 2014).



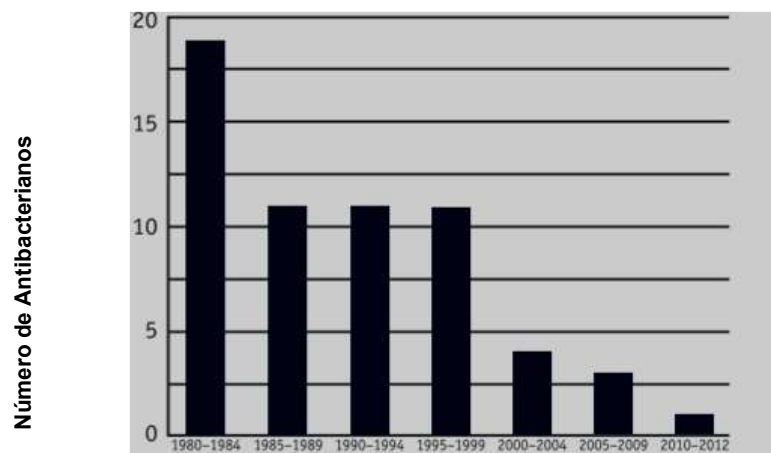
**Figura 1:** Problemas associados aos micro-organismos multirresistentes (MDR), extensamente resistentes (XDR) e pan-resistentes (PDR). Fonte: Adaptado de TANWAR *et al.* (2014)

O uso de antibacterianos é de extrema importância para a medicina moderna, pois reduz a mortalidade infantil e aumenta a expectativa de vida da população. No entanto, o número de infecções causadas por bactérias MDR, XDR e PDR está aumentando globalmente, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, e o surgimento de infecções intratáveis está se tornando uma realidade (BLAIR *et al.*, 2014; WHO, 2014).

Um estudo realizado por Boeckel e colaboradores, em 2014, mostrou que entre os anos de 2000 e 2010 o consumo de antibacterianos aumentou em 36%, passando de 54 bilhões para 73 bilhões de unidades. Além disso, o Brasil, juntamente com outros países em desenvolvimento como Rússia, Índia, China e África do Sul, foram responsáveis por 76% desse aumento (Figura 2). A situação é agravada ainda, por um declínio substancial em pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. Desse modo, poucas novas classes de antibacterianos são trazidas ao mercado (Figura 3) enquanto as classes mais antigas perdem a sua eficácia (Figura 4) (HOGBERG; HEDDINI; CARS, 2010)

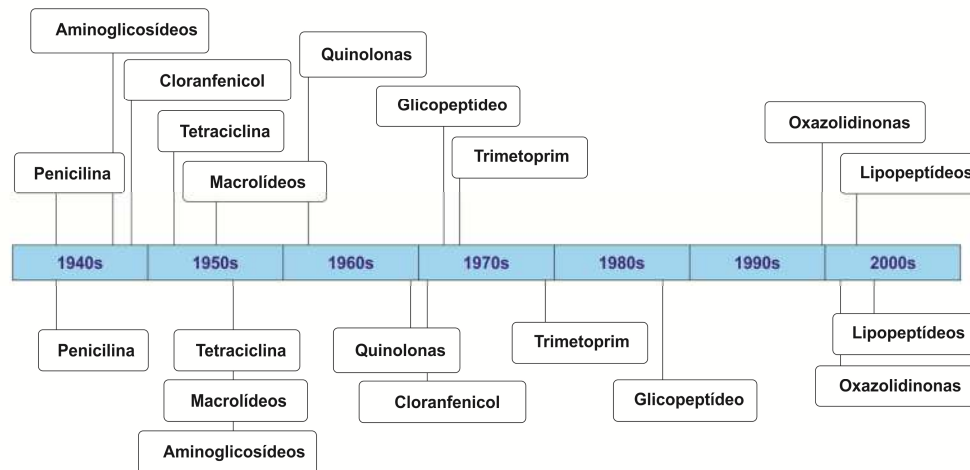


**Figura 2:** Consumo mundial de antibacterianos. (A): Consumo em 2010, expresso em unidades padrão (ou seja, comprimido, cápsula ou ampola) por pessoa. (B): Taxa de crescimento anual do consumo de antibacterianos entre 2000 e 2010. Fonte: Adaptado de BOECKEL *et al.*, (2014).



**Figura 3:** Número de novos antibacterianos aprovados para uso humano entre 1980 e 2012. Fonte: Adaptado de FRIEDEN (2013).

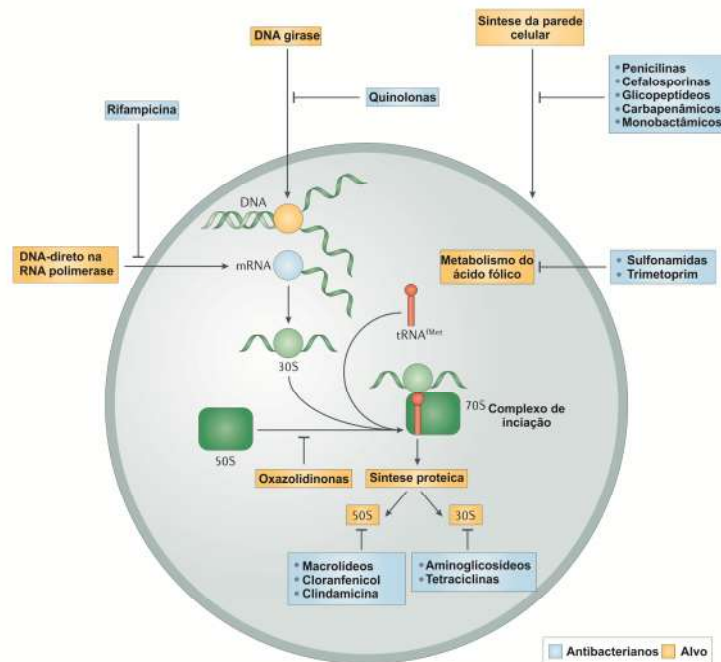
### Introdução dos antibacterianos na prática clínica



### Primeiro relato de resistência

**Figura 4:** Introdução de novos fármacos na prática clínica e o desenvolvimento da resistência bacteriana. Fonte: Adaptado de HÖGBERG *et al.* (2010).

De acordo com seu mecanismo de ação, os antibacterianos são classificados com base no componente celular ou sistema que afetam, como antibacterianos indutores da morte celular (fármacos bactericidas) ou como inibidores do crescimento celular (fármacos bacteriostáticos). A maioria dos antibacterianos bactericidas atuais inibem a síntese de ácidos nucleicos, a síntese da parede celular ou a síntese de proteínas (Figura 5) (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010).



**Figura 5:** Principais alvos dos antibacterianos. Os antibacterianos de maior uso atingem apenas três alvos ou vias: os ribossomos (que consistem em subunidades 50S e 30S), síntese da parede celular e DNA-RNA. Fonte: Adaptado de LEWIS (2013).

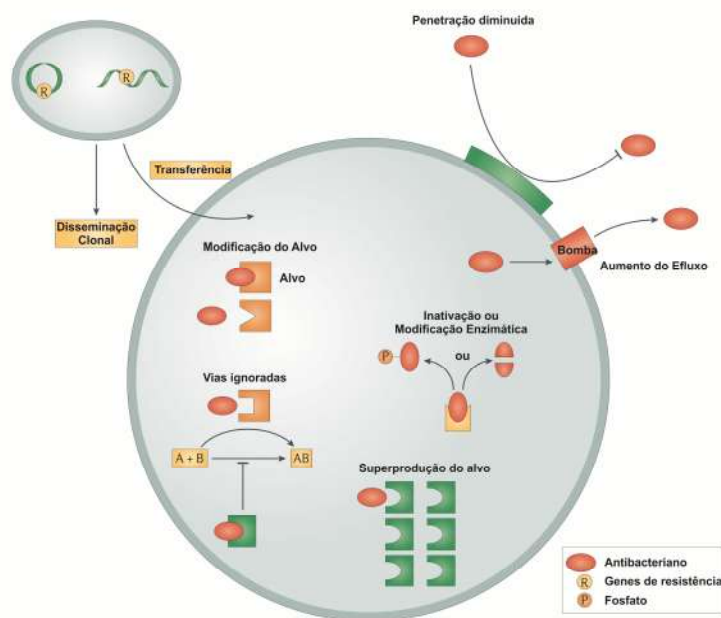
As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a certos antibacterianos, como também podem adquirir essa resistência através de mutações nos genes cromossômicos e por transferência horizontal de genes, através de elementos genéticos móveis (BLAIR *et al.*, 2015).

A resistência intrínseca de uma espécie bacteriana a um antibacteriano em particular é a capacidade de resistir à ação do referido antibacteriano como resultado das características estruturais ou funcionais inerentes. A ausência de um alvo susceptível e diferenças na composição da membrana citoplasmática ou parede celular (como entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas) são exemplos de características intrínsecas das bactérias que podem levar a uma ação ineficaz de determinado antibacteriano (BLAIR *et al.*, 2014).

Além da resistência intrínseca, as bactérias podem adquirir ou desenvolver resistência aos antibacterianos. Isto pode ser mediado através de vários mecanismos, que podem ser divididos em três grupos principais: 1) aqueles que minimizam as concentrações intracelulares do fármaco como resultado de uma fraca penetração na bactéria ou de efluxo; 2) aqueles que modificam o alvo do fármaco



por mutação genética ou modificação pós-transcricional; 3) aqueles que inativam o fármaco por hidrólise ou modificação em sua estrutura (BLAIR *et al.*, 2014). Os principais tipos de mecanismos clinicamente relevantes de resistência aos antibacterianos estão representados na Figura 6.



**Figura 6:** Principais mecanismos de resistência das bactérias aos antibacterianos. Fonte: Adaptado de LEWIS (2013).

## 2.2 Principais bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar

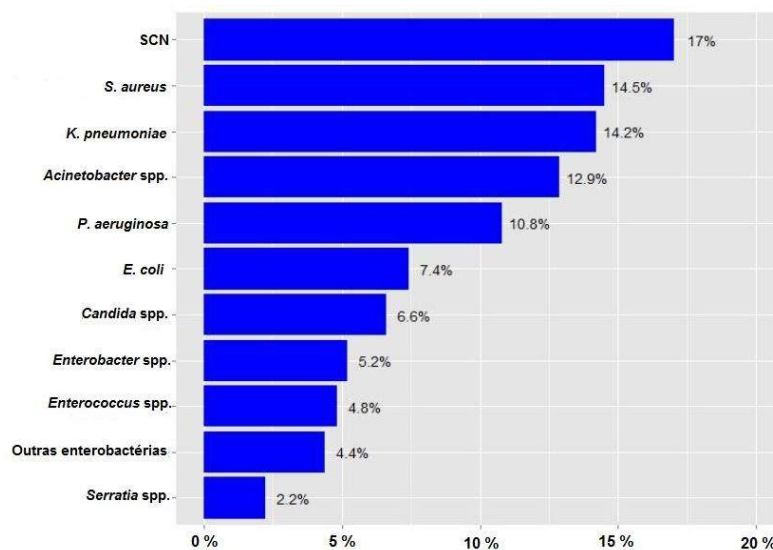
No Brasil, conforme a Portaria n.º 2.616 de 12 de maio de 1998, infecção hospitalar é definida pelo Ministério da Saúde como qualquer infecção adquirida após admissão do paciente no hospital e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou com os procedimentos hospitalares. São também consideradas hospitalares aquelas infecções manifestadas antes de 72 horas da internação, quando associadas a procedimentos de diagnóstico e/ou terapêuticos realizados depois da mesma (BRASIL, 1998).

Diferentes micro-organismos como bactérias, fungos e vírus causam infecções hospitalares. No entanto, o grupo de patógenos que se destaca é o das bactérias (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE

VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). As bactérias mais prevalentes em infecções hospitalares são: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* (BACCHI *et al.*, 2014) e estão envolvidas principalmente em pneumonias, infecções da corrente sanguínea, infecções do trato urinário, infecções de cateter venoso central e infecções de sítio cirúrgico (MENEGUETI *et al.*, 2015).

Embora a resistência aos antibacterianos possa ser um problema em uma ampla gama de bactérias, um número limitado tem sido descrito como sendo particularmente importante clinicamente. Esses incluem *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (HÖGBERG *et al.*, 2010).

A Rede Nacional de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços em Saúde (Rede RM), criada pela ANVISA, publicou, no ano de 2015, a distribuição dos micro-organismos notificados como agentes etiológicos de infecção primária da corrente sanguínea (IPCS) associada ao uso de cateter venoso central (CVC) em pacientes adultos hospitalizados em UTIs, sendo o *Staphylococcus coagulase-negativo* (SCN) o mais prevalente (17,0 %), seguido de *S. aureus* (14,5%) e *K. pneumoniae* (14,2%) (Figura 7):



**Figura 7:** Distribuição dos micro-organismos notificados como agentes etiológicos de infecções de corrente sanguínea relacionada a uso de cateter venoso em pacientes adultos hospitalizados em UTIs em 2014. SCN: *Staphylococcus coagulase-negativo*. Fonte: ANVISA (2015).

## 2.2.1 Principais bactérias Gram-positivas multirresistentes

### *Enterococcus*

*Enterococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, com formato oval e que formam cadeias de vários comprimentos. Apresentam grande versatilidade e podem sobreviver em condições adversas, como em uma ampla faixa de temperatura (10 - 45°C) e pH (4,6 - 9,9) e na presença de altas concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e sais biliares. Portanto, existem poucas condições que possibilitam a inibição de seu crescimento (ARIAS; MURRAY, 2012; MURRAY, 2014).

Os *Enterococcus* geralmente exibem baixos níveis de virulência, como evidenciado por sua presença como colonizadores naturais do trato gastrointestinal na maior parte dos seres humanos e animais e pelo fato de terem sido utilizados com segurança durante décadas como probióticos em seres humanos e animais (ARIAS; MURRAY, 2012).

*Enterococcus* tornou-se um grande problema em pacientes hospitalizados, sendo uma importante causa de infecções do trato urinário, sítios cirúrgicos, bacteremia e endocardite (SHOKOOHIZADEH *et al.*, 2013; MURRAY, 2014). Dentre os *Enterococcus*, as cepas resistentes à vancomicina (VRE) tem se destacado nas últimas duas décadas em todo o mundo devido a limitações nas opções clínicas disponíveis para o tratamento de infecções causadas por esses agentes (SUJATHA; PRAHARAJ, 2012). Dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention* - CDC) mostraram que ocorrem anualmente 66.000 infecções por *Enterococcus*, sendo cerca de 30% causadas por VRE, com 1.300 mortes por ano (FRIEDEN, 2013).

VRE pertencente à espécie *E. faecium* foi descrito pela primeira vez em isolados clínicos na Inglaterra e na França em 1986 (LECLERCQ *et al.*, 1989). No ano de 2002, houve uma disseminação mundial de VRE, aumentando a ameaça de colonização e infecção por essa bactéria. Atualmente, 54 espécies diferentes e duas subespécies de *Enterococcus* foram descritos, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as espécies de maior relevância clínica (CRANK; O'DRISCOLL, 2015). Normalmente, *E. faecalis* são mais patogênicos que espécies de *E. faecium*, no entanto *E. faecium* apresentam maior resistência aos antibacterianos (CRANK; O'DRISCOLL, 2015).

Os *Enterococcus* são intrinsecamente resistentes a muitos antibacterianos comumente utilizados (p. ex., oxacilina, cefalosporinas) ou possuem genes de resistência adquirida (p. ex., aminoglicosídeos, vancomicina) (MURRAY, 2014). VREs apresentam ampla heterogeneidade, tanto fenotípica quanto genotípica, sendo que vários genes responsáveis pelo fenótipo de resistência à vancomicina já foram relatados (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* e *vanN*), conforme descrito na Tabela 1 (SUJATHA; PRAHARAJ, 2012). Além de exibirem uma grande variedade de mecanismos de resistência, possuem também notável plasticidade em seu genoma e utilizam plasmídeos, transposons e sequências de inserção para alcançar de forma eficiente a transferência de elementos genéticos móveis, facilitando a disseminação de genes de resistência (CATTOIR; LECLERCQ, 2013; CRANK; O'DRISCOLL, 2015).

**Tabela 1:** O "Alfabeto Van": fenótipos e genótipos de *Enterococcus* resistentes à vancomicina. Fonte: Adaptado de SUJATHA e PRAHARAJ (2012)

Fenótipo	Genótipo	Resistência aos glicopeptídeos	Tipo de Resistência
VanA (comumente em <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> )	<i>vanA</i>	Resistência a altos níveis de vancomicina CMI: 64 - ≥ 1000 µg/mL; Resistência a altos níveis de teicoplanina CMI: 16-512 µg/mL	Resistência a altos níveis induzível
VanB (comumente em <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> )	<i>vanB</i>	Resistência a altos níveis de vancomicina CMI 4 - 512 µg/mL; Sensível a teicoplanina: CMI ≤ 0,5 µg/mL	Resistência a altos níveis induzível
VanC ( <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. flavescens</i> )	<i>vanC1</i> , <i>vanC2</i> , <i>vanC3</i>	Resistência a baixos níveis de vancomicina CMI 2 - 32 µg/mL; Sensível a teicoplanina: CMI ≤ 0,5 µg/mL	Resistência a baixo nível - constitutiva
VanD	<i>vanD</i>	Resistência moderado-alto níveis de vancomicina CMI 64-256 µg/mL; Resistência a baixos níveis de teicoplanina CMI 4-32 µg/mL	Resistência induzível
VanE	<i>vanE</i>	Resistência a baixo nível de vancomicina CMI 16 µg/mL; Sensível a teicoplanina: CMI ≤ 0,5 µg/mL	Resistência induzível
VanG	<i>vanG</i>	Resistência a baixos níveis de vancomicina CMI < 16 µg/mL; Sensível a teicoplanina: CMI ≤ 0,5 µg/mL	Resistência induzível
VanL	<i>vanL</i>	Resistência a baixos níveis de vancomicina CMI 8 µg/mL; Sensível a teicoplanina	Resistência induzível
VanM	<i>vanM</i>	Resistência a altos níveis de vancomicina CMI > 256 µg/mL; Resistência a altos níveis de teicoplanina	Resistência induzível
VanN	<i>vanN</i>	Resistência a baixos níveis de vancomicina CMI 16 µg/mL; Sensível a teicoplanina CMI ≤ 0,5 µg/mL	Resistência constitutiva

Devido aos múltiplos mecanismos de resistência encontrados em VRE, as opções de tratamento são limitadas. Os agentes recomendados para este fim, a linezolida e a quinupristina/dalfopristina (exceto em *E. faecalis*) são as poucas

opções de tratamento disponíveis atualmente (CRANK; O'DRISCOLL, 2015; SHOKOOHIZADEH *et al.*, 2013). Entretanto, *Enterococcus* não susceptíveis à linezolidina já foram relatados (O'DRISCOLL *et al.*, 2015) e o mecanismo de resistência mais comum deve-se a mutações no domínio V do gene rRNA 23S (NTOKOU *et al.*, 2012; MENDES; DESHPANDE; JONES, 2014).

### *Staphylococcus*

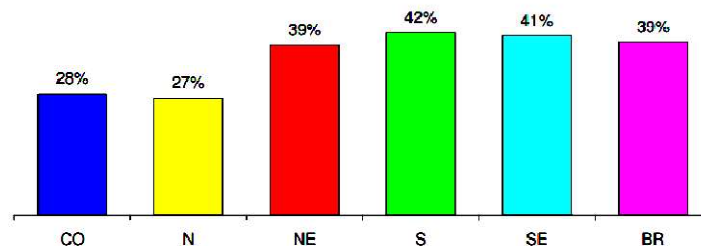
*Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, os quais se apresentam dispostos em forma de “cachos de uvas”. A maioria dos *Staphylococcus* possui um diâmetro variando entre 0,5 e 1,5 µm e são capazes de crescer em condições aeróbicas e anaeróbicas. Além disso, possuem capacidade de crescimento em concentrações elevadas de sal (NaCl 10%) e temperaturas variadas (18-40°C) (MURRAY, 2014).

Dentre os *Staphylococcus*, *S. aureus* é uma bactéria de significativa importância, devido a sua capacidade de causar uma ampla gama de doenças e se adaptar a diversas condições ambientais. Essa bactéria coloniza, normalmente, a pele e o nariz, tanto em humanos como em animais (BATBYAL; KUNDU; BISWAS, 2012; GREMA, 2015). No entanto, podem causar infecções principalmente na pele e em tecidos moles. Seus fatores de virulência incluem componentes estruturais que facilitam a adesão aos tecidos do hospedeiro e evitam a fagocitose (cápsula, ácido teicóico e proteína A), uma variedade de enzimas hidrolíticas (coagulase, hialuronidase, fibrinolisinases, lipases e nucleases) e toxinas (citotoxinas, toxinas esfoliativas, enterotoxinas e toxina 1 da síndrome do choque tóxico) (MURRAY, 2014). As principais doenças causadas por *S. aureus* são foliculite, furúnculos, carbúnculos, impetigo, infecções de feridas e síndrome da pele escaldada. Infecções mais graves incluem bacteremia, pneumonia, endocardite, infecções ósseas e articulares e síndrome do choque tóxico (PEACOCK; PATERSON, 2015).

A penicilina e seus derivados, incluindo a meticilina, foram extensivamente utilizados para tratamentos das infecções causadas por *S. aureus*. No entanto, estirpes de *S. aureus* desenvolveram resistência à esses antibacterianos, sendo denominados desse modo como *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus* – MRSA) (GORDON, LOWY, 2008; DAVID; DAUM, 2010; KÖCK *et al.*, 2010; BATBYAL; KUNDU; BISWAS, 2012; WENDLANDT, SCHWARZ, SILLEY, 2013).

Nos últimos anos, infecções por MRSA associado à comunidade (CA-MRSA) surgiram em todo o mundo (KANG; SONG, 2013). Tais isolados estavam relacionados à presença da Leucocidina de Pantón-Valentine (PVL). A produção da PVL está associada à pneumonia necrosante, uma doença grave. Essa toxina se liga a membrana plasmática de polimorfonucleares, monócitos e macrófagos promovendo a abertura de canais de cálcio o que leva ao influxo do mesmo, indução de mediadores da inflamação e apoptose ou necrose (CUPANE *et al.*, 2012).

No Brasil, em julho de 2006, a Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) iniciou o monitoramento do perfil de sensibilidade de agentes prioritários de infecções primárias de corrente sanguínea em pacientes de terapia intensiva. Até junho de 2008, 97 hospitais participaram de alguma forma no envio mensal de dados. Entre os 2.406 microorganismos do gênero *Staphylococcus* testados para oxacilina/meticilina, foi verificada a sensibilidade em apenas 20% dos *Staphylococcus* coagulase-negativo (N=1483) e em 39% dos *S. aureus* (N=897) nos 24 meses do monitoramento, variando entre 36% (jul-dez/2007) e 42% (jan-jun/2007). Os menores níveis de sensibilidade dos *S. aureus* à oxacilina foram observados nas Regiões Norte (27% N=15) e Centro-Oeste (28% N=47), sendo semelhantes para as regiões Nordeste (39% N=230), Sudeste (41% N=554), e Sul (42% N=77), conforme esquematizado na Figura 8.



**Figura 8.** Taxas de resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* isolados de infecções primárias de corrente sanguínea por região geográfica em pacientes em terapia intensiva durante o período de 2006 a 2008, notificadas pelos Hospitais Colaboradores da Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços da Saúde (Rede RM). Legenda: CO – região Centro-Oeste; N – região Norte; NE – região Nordeste; S – região Sul; SE – região Sudeste; BR – Brasil. Fonte: Rede RM, 2008.

Dados do CDC dos Estados Unidos, mostram que somente no ano de 2011 ocorreram 80.461 infecções por MRSA com consequentes 11.285 mortes (FRIEDEN, 2013).

A resistência à meticilina é desenvolvida através da aquisição do elemento genético móvel *SCCmec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), que alberga o gene *mecA*, que codifica a proteína de ligação à penicilina alterada (PBP2a) sem afinidade pelo fármaco. Atualmente, existem descritos 11 tipos distintos de *SCCmec*, classificados de I ao XI ([http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_TypesEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html), acessado em outubro de 2016), os quais diferem na combinação do tipo de complexo de genes *ccr* e na classe de complexo de genes *mec* presentes no cassete (VALLE *et al.*, 2016). Estudos tem demonstrado que cepas de MRSA hospitalares contêm principalmente cassetes *SCCmec* do tipo I, II e III, enquanto cepas adquiridas na comunidade contêm, principalmente, os cassetes tipo IV e V (LAKSHMI, 2015; CAVALCANTE *et al.*, 2014).

MRSA pode também adquirir resistência a agentes antimicrobianos alternativos, complicando ainda mais o tratamento de infecções. Esta resistência envolve a vancomicina, a qual é considerada como uma das principais opções de tratamento para infecções graves por MRSA (PEACOCK; PATERSON, 2015). No Brasil, um estudo realizado em São Paulo detectou a primeira amostra clínica de VRSA em nosso país, designado BR-VRSA. Essa amostra era inicialmente um MRSA sensível à vancomicina, que durante a antibioticoterapia adquiriu o gene de resistência *vanA*. Amostra de *swab* retal do paciente indicou colonização com *E. faecalis* resistente à vancomicina (VREf). Hemoculturas foram positivas para dois isolados de MRSA, sendo um resistente tanto para vancomicina (CMI >32 µg/mL) quanto para teicoplanina (CMI 32 µg/mL). Estudos moleculares e filogenéticos detectaram que o MRSA apresentava *SCCmecIV* e ST 8. O plasmídeo chamado pBRZ01 mostrou-se geneticamente semelhante ao plasmídeo australiano (pWBG745) associado a cepas de *S. aureus* adquiridos na comunidade (CA-MRSA). Além disso, também apresentou sequências idênticas à plasmídeos típicos de *E. faecalis*. A presença e disseminação de MRSA associado a comunidade contendo *vanA* poderá tornar-se um sério problema de saúde pública (ROSSI *et al.*, 2014).

## 2.2.2 Principais bactérias Gram-negativas multirresistentes

### Enterobactérias

A família *Enterobacteriaceae* é o maior e mais heterogêneo grupo de bacilos Gram-negativos com importância clínica e apresenta mais de 50 gêneros e centenas de espécies e subespécies. Apesar da complexidade desta família, a maioria das infecções humanas são causadas por relativamente poucas espécies, as quais incluem principalmente: *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Shigella* spp. e *Yersinia* spp. (MURRAY, 2014).

Membros da família *Enterobacteriaceae* são encontrados universalmente na natureza, além de fazerem parte da microbiota intestinal normal de diversos animais, incluindo os seres humanos. Eles produzem uma grande variedade de doenças em seres humanos, incluindo infecções do trato urinário, septicemia, além de infecções intestinais (WINN *et al*, 2008). Alguns micro-organismos (por exemplo: *Salmonella* Typhi, *Shigella*, *Yersinia pestis*) estão sempre associados com doença em seres humanos, enquanto outros (por exemplo: *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*) fazem parte da microbiota comensal normal e podem causar infecções oportunistas (MURRAY, 2014). Apesar de fazer parte da microbiota comensal humana, algumas enterobactérias podem adquirir genes de virulência presentes em plasmídeos ou bacteriófagos, tais como os que conferem resistência aos antibacterianos. A produção de beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência das enterobactérias aos beta-lactâmicos, como as chamadas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), que possuem a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (OLIVEIRA; VAN DER SAND, 2016). Carbapenêmicos são agentes antibacterianos de largo espectro, considerado última linha terapêutica para muitas infecções bacterianas graves. Entretanto, a crescente difusão de carbapenemases foi observada em todo o mundo e é uma das principais questões em medicina, deixando os clínicos com poucas opções de tratamento (NORDMANN *et al.*, 2012). Esses organismos produtores de carbapenemases são referidos como enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (CRE), pois são resistentes a esse e a quase totalidade de classes de antibacterianos beta-lactâmicos disponíveis atualmente (FRIEDEN, 2013).



**Tabela 2:** Classificação das beta-lactamases. Fonte: Adaptado de BUSH e FISHER (2011).

Grupo Funcional	Classe Molecular	Exemplos	Características
1	C	AmpC de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E.coli</i> , CMY-2, FOX-1, MIR-1,P99	Hidrólise de cefalosporinas e cefamicinas. Não são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. Alta afinidade pelo aztreonam.
1e	C	GC1, CMY-37	Hidrólise de penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. Não são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2a	A	PC1 e outras penicilinases de <i>Staphylococcus</i>	Hidrólise eficiente de penicilinas. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2b	A	SHV-1, TEM-1,TEM-2, TLE-1 (TEM-90)	Hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2be	A	ESBLs: CTX-M-15, CTX-M-44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM26, VEB-1	Hidrólise de penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2br	A	TEM-30,TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26.	Hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações. Não são bem inibidas por ácido clavulânico.
2ber	A	TEM-50, TEM-68, TEM-89	Hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos. São pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2c	A	PSE-1, CARB-3	Hidrólise eficiente de carbenicilina. Inibidas por ácido clavulânico.
2d	D	OXA-1, OXA-10	Hidrólise eficiente de cloxacilina ou oxacilina. Nem sempre inibidas por ácido clavulânico.
2de	D	OXA-11, OXA-15	Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro. Nem sempre inibidas por ácido clavulânico.
2df	D	OXA-23, OXA-48	Hidrólise de carbapenêmicos e cloxacilina ou oxacilina. Nem sempre inibidas por ácido clavulânico.
2e	A	CepA	Hidrólise eficiente de cefalosporinas. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, mas não por aztreonam.
2f	A	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2	Hidrólise de carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e cefamicinas. São pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3a	B	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1	Hidrólise de todos os beta-lactâmicos exceto monobactâmicos. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3b	B	CphA, Sfh-1	Hidrólise preferencial de carbapenêmicos. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
4	ND		Enzimas não sequenciadas, que não são categorizadas em outros grupos.

ND: não determinado.

As enzimas beta-lactamases, já foram classificadas de diferentes formas desde sua descoberta. A classificação de Ambler é baseada na estrutura molecular (homologia na sequência de aminoácidos), estando dividida em quatro classes, denominadas A, B, C e D. As enzimas do grupo A, C e D são as serino-beta-

lactamases, ou seja, possuem o aminoácido serina no sítio ativo da enzima; enquanto que as enzimas da classe B possuem Zinco ( $Zn^{2+}$ ) no sítio ativo, sendo consideradas metalo-beta-lactamases (AMBLER, 1980).

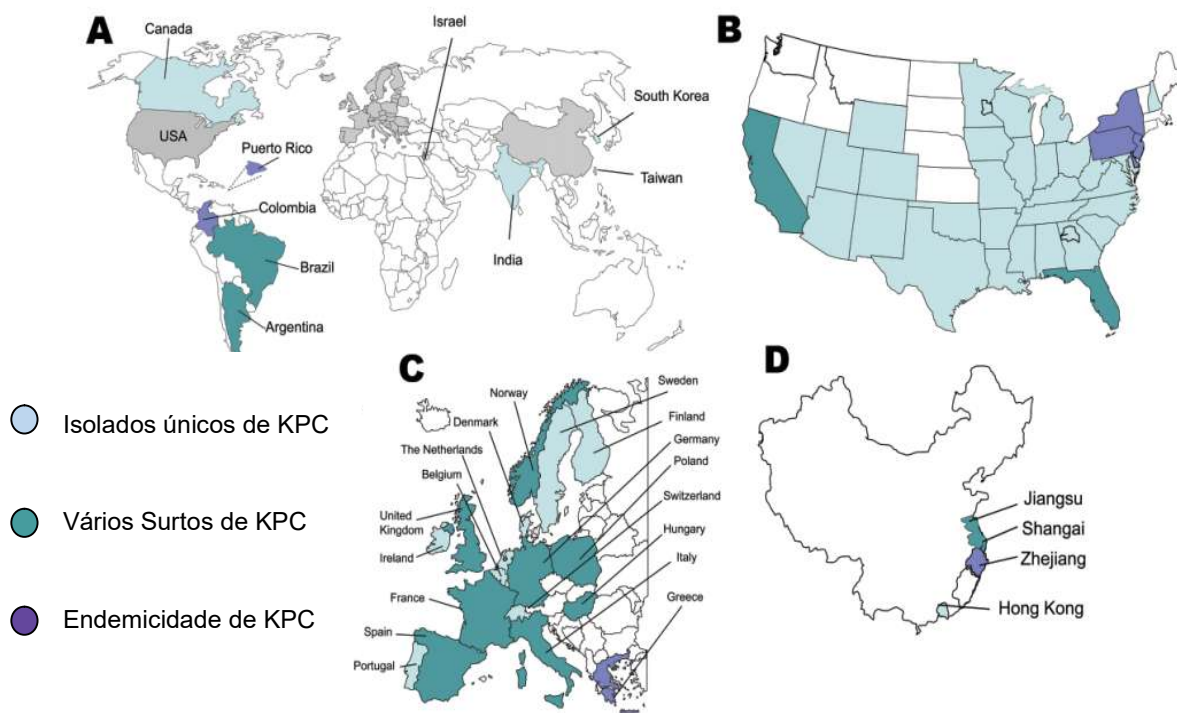
Atualmente, a classificação de Bush, Jacoby e Medeiros é a mais aceita. Ela correlaciona as funções e características estruturais e bioquímicas resultando em quatro grupos funcionais (grupos de 1 a 4), com vários subgrupos no grupo 2 que são diferenciados de acordo com o substrato preferencial, características estruturais e propriedades inibitórias (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). A correspondência entre essas duas classificações foi atualizada em 2010 por Bush e Jacoby (BUSH; JACOBY, 2010). A Tabela 2 mostra a classificação atual das beta-lactamases.

Dados do CDC dos Estados Unidos estimam que ocorram anualmente cerca de 9.300 infecções associadas aos cuidados de saúde causadas por CRE. Desse total, até metade das infecções levam à morte dos pacientes (FRIEDEN, 2013).

No grupo das Enterobactérias, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* destacam-se como as espécies mais comumente relacionadas com a produção de beta-lactamases (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A propagação mundial das carbapenemases da classe A (KPC) e da classe B (VIM, IMP, NDM) nessas enterobactérias foi o prenúncio dos patógenos denominados pan-resistentes (CAG *et al.*, 2016). Pacientes com infecções por CRE são tratados com antibacterianos de último recurso, como a colistina e a polimixina B (ZOWAWI *et al.*, 2015). Entretanto, em novembro de 2015, foi relatado a detecção de um mecanismo de resistência à colistina por meio de plasmídeos, relacionado ao gene denominado *mcr-1* (*mobile colistin resistance*), produtor de uma enzima responsável pela resistência a esse fármaco. O impacto clínico desse relato é que pelo fato do gene *mcr-1* estar localizado em um plasmídeo, a disseminação da resistência pode ser compartilhada entre bactérias (LIU *et al.*, 2015). Bacilos Gram-negativos resistentes à colistina já foram descritos em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (FERNANDES *et al.*, 2016).

*K. pneumoniae* pode ser amplamente encontrada águas superficiais, esgotos, solo e até mesmo sobre plantas, enquanto que no hospedeiro humano pode ser localizada na nasofaringe e no trato intestinal (JESUS *et al.*, 2015). Esse patógeno é comumente implicado em surtos hospitalares em vários países ao redor do mundo, com uma propensão para a resistência aos antibacterianos (ARNOLD *et al.*, 2011).

O aumento da incidência de *K. pneumoniae* produtora da enzima carbapenemase do tipo KPC em todo o mundo (Figura 9) tem se tornado significativo para a saúde pública, pois infecções causadas por esse patógeno estão associadas com falha terapêutica, aumento de custos, do tempo de internação e alta mortalidade dos pacientes acometidos (22-72%) (ARNOLD *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2011; LEE; BURGESS, 2012; TIJET *et al.*, 2014; TUMBARELLO *et al.*, 2014). Somente no ano de 2011 nos Estados Unidos, ocorreram cerca de 7.900 infecções por *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases, com consequentes 520 mortes (FRIEDEN, 2013).



**Figura 9:** A) Distribuição geográfica mundial de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase tipo KPC. Sombreamento cinza indica regiões mostradas separadamente: B) distribuição nos Estados Unidos; C) distribuição na Europa; D) distribuição na China. Fonte: Adaptado de NORDMANN *et al.* (2011).

Os principais grupos de risco para infecções por *K. pneumoniae* incluem pacientes com idade avançada, com quadros graves, que realizaram tratamentos anteriores com antibacterianos, que realizaram transplante de órgãos ou de células-tronco e sob ventilação mecânica (ARNOLD *et al.*, 2011). Nesses pacientes, *K.*

*pneumoniae* pode causar diversos tipos de infecções incluindo pneumonia, infecções da corrente sanguínea, infecções de feridas e ou de sítios cirúrgicos e meningite (SHON; BAJWA; RUSSO, 2013).

#### Bacilos Gram-negativos não fermentadores

Bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF) são amplamente distribuídos na natureza e são altamente associados a infecções hospitalares oportunistas graves, principalmente em pacientes imunocomprometidos (MESAROS *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2007). BGNNF apresentam resistência intrínseca a vários antimicrobianos disponíveis. Além disso, apresentam grande capacidade de adquirir genes de resistência por transferência horizontal (PATERSON, 2006).

A relevância clínica de infecções associadas aos BGNNF multirresistentes é caracterizada pela sua natureza oportunista e seu tratamento e controle serem trabalhosos e onerosos (FURTADO *et al.*, 2006). Essas infecções são, frequentemente, encontradas em pacientes sob cuidados intensivos com sintomas de pneumonia associada à ventilação mecânica, fibrose cística, infecções cutâneas, bacteremia relacionada a cateter venoso central e infecções do trato urinário (RICE, 2006).

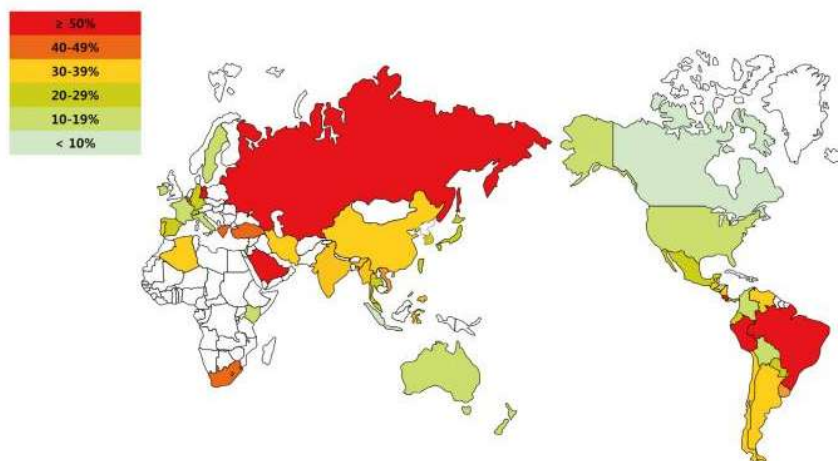
Entre os BGNNF, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* são os principais gêneros associados às infecções hospitalares e são bem conhecidos pela sua capacidade de expressar vários mecanismos de resistência aos antibacterianos, tais como, a produção de beta-lactamases, modificação das proteínas de membrana externa (porinas) e bombas de efluxo. A produção de beta-lactamases constitui o principal mecanismo de resistência dos BGNNF do ponto de vista epidemiológico, incluindo a produção de serina e metalo-beta-lactamase, que estão relacionadas com a resistência aos carbapenêmicos (BONOMO; SZABO, 2006). Metalo-beta-lactamases conferem resistência a todos os beta-lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos, são caracterizados pela hidrólise eficiente dos carbapenêmicos, resistem à ação de inibidores de beta-lactamases, e são sensíveis a ação de quelantes, como o EDTA (TADA *et al.*, 2015).

*Pseudomonas aeruginosa* é um importante patógeno relacionado a infecções hospitalares. A sua patogênese se deve a múltiplos fatores de virulência, tais como: adesinas, lipopolissacarídeo, cápsula de alginato, biofilme, toxinas e enzimas

diversas (exotoxina A, piocianina, pioverdina, proteases, elastases, fosfolipase C e exoenzimas S e T) (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; MURRAY, 2014).

Dados do CDC mostram que ocorrem anualmente nos Estados Unidos 51.000 infecções por *P. aeruginosa* associadas aos cuidados de saúde, sendo mais de 6.000 desse total (cerca de 13%) causado por cepas multirresistentes, com consequentes 400 mortes por ano (FRIEDEN, 2013).

*P. aeruginosa* possui resistência intrínseca a muitos antibacterianos incluindo alguns beta-lactâmicos, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, polimixinas e/ou podem sofrer mutações tornando-se resistentes durante o tratamento. Dentre os vários mecanismos de resistência, a mutação de proteínas porinas é de extrema importância, pois restringe o fluxo de antimicrobianos para o interior da célula (FRIEDEN, 2013; LIAKOPOULOS *et al.*, 2013). Desse modo, há um aumento na frequência do aparecimento de estirpes multirresistentes, com consequente redução significativa das opções terapêuticas (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009). Os carbapenêmicos são, geralmente, usados para tratar infecções graves provocadas por esses microrganismos. No entanto, nos últimos anos, houve um aumento na resistência a esses compostos, o qual foi observado em nível mundial (Figura 10) (HONG *et al.*, 2015).

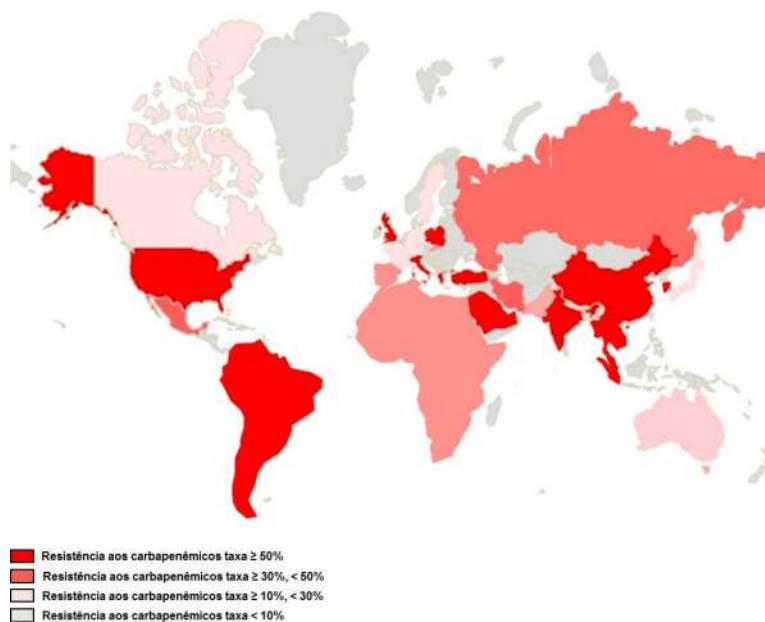


**Figura 10:** Distribuição geográfica de *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos. A maioria dos isolados foi coletada entre 2009-2011 com as seguintes exceções: Chile (2005), Quênia (2006 a 2007), e África do Sul (2006). As áreas brancas indicam que não há dados disponíveis publicados para essas regiões. Fonte: HONG *et al.* (2015).

Elevadas taxas de resistência aos carbapenêmicos tem sido relatadas nos hospitais brasileiros e a disseminação de um clone predominante, produtor de SPM-1 (São Paulo Metallo-beta-lactamase) já foi descrito em vários Estados. SPM-1 é uma metalo-beta-lactamase capaz de hidrolizar todos os antibacterianos beta-lactâmicos com exceção do aztreonam. Essa enzima foi identificada primeiramente em São Paulo e é considerada endêmica no Brasil (ROSSI, 2011; FONSECA *et al.*, 2015).

O gênero *Acinetobacter* é amplamente distribuído na natureza e, geralmente, ocorre no solo e na água. Durante as últimas décadas, tem sido cada vez mais reconhecido como um patógeno importante em infecções hospitalares, destacadamente, em pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções da corrente sanguínea, de pele e tecidos moles, meningite e do trato urinário (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996; PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008). A espécie que é mais comumente envolvida em infecções hospitalares é *A. baumannii* e estudos tem relatado a ocorrência de *A. baumannii* MDR e até mesmo PDR em hospitais (DIJKSHOORN, NEMEC, SEIFERT, 2007; MIRHOSEINI *et al.*, 2016).

Ao longo dos últimos 10 anos, em todo o mundo, carbapenemases foram relatadas cada vez mais frequentemente em espécies *Acinetobacter* (KIM *et al.*, 2014) (Figura 11).



**Figura 11:** Epidemiologia global da resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter*. Fonte: Adaptado de KIM *et al.* (2014).

O mecanismo mais importante de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* é a hidrólise enzimática desses fármacos pelas beta-lactamases, incluindo as da classe A (TEM, SHV e GES), classe B (IMP, VIM, e SIM), classe C (AmpC) e a classe D (OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like, e OXA-58-like) (ZHAO *et al.*, 2015). Resistência a aminoglicosídeos em *A. baumannii* é mediada, principalmente, pela produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs). As AMEs mais frequentes em *A. baumannii* são AAC(6')-Ib e AAC (6')-II (NEMEC *et al.*, 2004; PELEG, SEIFERT, PATERSON, 2008). Somada a esses mecanismos de resistência, a perda da permeabilidade da membrana devido a alterações de porinas específicas, constitui um mecanismo intrínseco de resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* (FONSECA *et al.*, 2013). Dados do CDC dos Estados Unidos estimam que cerca de 12.000 infecções associadas aos cuidados hospitalares são causadas atualmente por *Acinetobacter baumannii*, sendo cerca de 63% desse total resistentes aos carbapenêmicos (FRIEDEN, 2013).

Diante da ampla gama de problemas ocasionados por bactérias multirresistentes, fica evidente que se faz necessário o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para tratamento de infecções causadas por esses micro-organismos.

## **2.3 Novas alternativas para tratamento de bactérias multirresistentes**

### **2.3.1 Novos antibacterianos aprovados**

Os antimicrobianos revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas, no entanto, o desenvolvimento de novos antimicrobianos é complicado e trabalhoso, pois além de exigir anos de pesquisas, é extremamente dispendioso para as indústrias farmacêuticas (QUEIROZ *et al.*, 2012).

A sensibilidade reduzida, a questão tolerância/toxicidade e o fato da grande maioria ser bacteriostático ou bactericida lento, são os principais desafios relacionados aos antimicrobianos disponíveis atualmente. Dessa forma, na tentativa de superar esses problemas buscam-se novas opções terapêuticas (QUEIROZ *et al.*, 2012). Com o crescente aumento da prevalência de bactérias multirresistentes e as poucas opções terapêuticas, alguns antibacterianos em desuso há anos (colistina, fosfomicina, temociclina, rifampicina) foram resgatados para a prática clínica, visando enfrentar esse problema de saúde pública, em especial entre os Gram-negativos (TANEJA, KAUR, 2016).

Dentre os antimicrobianos desenvolvidos nas últimas décadas e liberados pela FDA para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos multirresistentes podem ser citados: linezolida (2000), cefditoreno pivoxil (2001), ertapenem (2001), daptomicina (2003), telitromicina (2004), tigeciclina (2005), doripenem (2007), ceftarolina (2010) dentre outros (QUEIROZ *et al.*, 2012).

**Tabela 3:** Novos antibacterianos aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) entre os anos de 2010-2015. Fonte: Adaptado de DEAK *et al.* (2016).

Antibacteriano	Data de aprovação	Classe do antibacteriano (ano de descoberta)	Novo mecanismo de ação	Indicações	Atividade in vitro sobre ESKAPE
Ceftaroline	29/10/2010	cefalosporina (1928)	não	infecção aguda de pele	sim
Fidaxomicina	27/05/2011	macrolídeo (1948)	não	<i>Clostridium difficile</i> e prevenção de recorrências	não
Bedaquilina	28/12/2012	diarilquinolina (1997)	sim	tuberculose pulmonar causada por MDR	não
Dalbavancina	23/05/2014	lipoglicopeptídeo (1953)	não	infecção aguda de pele	não
Tedizolida	20/06/2014	oxazolidinona (1955)	não	infecção aguda de pele	não
Oritavacina	06/08/2014	glicopeptídeo (1953)	não	infecção aguda de pele	não
Ceftolozane-tazobactam	19/12/2014	cefalosporina (1928) + inibidor de beta-lactamase	não	infecção intra-abdominal/infecção urinária complicada	sim
Ceftazidima-avibactam	25/02/2015	cefalosporina (1928) + inibidor de beta-lactamase	não	infecção intra-abdominal/infecção urinária complicada	sim

**ESKAPE:** *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*.

**MDR:** Multidroga resistente.

Segundo Deak e colaboradores (2016), entre os anos de 2010 e 2015 apenas oito novos antibacterianos foram aprovados para uso humano pela FDA dos Estados Unidos: ceftaroline, fidaxomicina, bedaquilina, dalbavancin, tedizolida, oritavancina, ceftolozane-tazobactam e ceftazidima-avibactam (DEAK *et al.*, 2016). No entanto, esse mesmo estudo conclui que a maioria desses fármacos foram aprovados para a mesma indicação e apenas um, bedaquilina, constitui uma nova classe de antibacteriano e seu alvo é a ATP sintase do *Mycobacterium tuberculosis*. Além disso, inúmeras deficiências foram identificadas em ensaios clínicos no momento da



aprovação e apenas um fármaco foi estudado em pacientes com doenças provocadas por micro-organismos MDR (DEAK *et al.*, 2016). Os principais detalhes desses antibacterianos estão representados na Tabela 3.

### 2.3.2 Produtos Naturais

Produtos naturais tem sido utilizados há séculos, com exemplos que remontam aos primórdios da história (PATRIDGE *et al.*, 2016). No entanto, desde a sua descoberta, os medicamentos à base de produtos naturais estão associados à dificuldades intrínsecas em sua obtenção, levando desse modo a indústria farmacêutica a mudar seu foco principal em direção aos compostos sintéticos para a descoberta de novas drogas. No entanto, os resultados obtidos não satisfizeram as expectativas, como ficou evidente pela diminuição do número de novos medicamentos que chegam ao mercado anualmente, levando novamente ao interesse na descoberta de medicamentos à base de produtos naturais (ATANASOV *et al.*, 2015; HARVEY, EDRADA-EBEL, QUINN, 2015). Portanto, esses produtos continuam desempenhando, atualmente, um papel significativo nos processos de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Em geral, produtos naturais são definidos como compostos químicos complexos que apresentam uma miríade de ação farmacológica e/ou biológica. (NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2008). Esses compostos compreendem os metabólitos secundários, que são produtos derivados do metabolismo primário de plantas, principalmente como resposta a alguns estímulos, tais como por ação de micro-organismos, insetos e herbívoros (FUMAGALI *et al.*, 2008).

Dentre os produtos naturais, as plantas são uma rica fonte de agentes terapêuticos e bases para fármacos sintéticos. Entre janeiro de 1981 e dezembro de 2014, 1.562 novos princípios ativos foram aprovados como fármacos. Dentre eles, 31% correspondem a produtos de origem natural, seus derivados semissintéticos e produtos sintetizados com grupos farmacofóricos baseados em produtos naturais (PATRIDGE *et al.*, 2016; NEWMANN, CRAGG, 2016).

Apesar do avanço em síntese orgânica, atualmente, 25% dos medicamentos prescritos em todo o mundo ainda são derivados de vegetais, mostrando, desse

modo, que espécies de plantas ainda são uma importante fonte de novos medicamentos para as doenças que continuam sem opção de tratamento (DAMASCENO *et al.*, 2015; KITAGAWA *et al.*, 2015; NEWMAN, CRAGG, 2012).

Diversas plantas têm levado ao desenvolvimento de novos fármacos, principalmente por sua composição química e atividade biológica. Na literatura são descritas inúmeras moléculas bioativas, tais como óleos essenciais, terpenóides, alcalóides, saponinas, flavonoides, antraquinonas e cumarinas (ROUT *et al.*, 2009). Dentre as classes de metabólitos secundários, as cumarinas merecem destaque. Foram inicialmente identificadas por Vogel em 1820, que isolou pela primeira vez a 1,2-benzopirona, mais conhecida como cumarina, da planta *Coumarona odorata* (RIBEIRO, KAPLAN, 2002).

De acordo com sua estrutura, as cumarinas são lactonas do ácido o-hidroxicinâmico e, atualmente, são divididas em cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas, isocumarinas e cumarinas mistas. Inúmeros fármacos foram desenvolvidos a partir desta classe de substâncias sendo que este grupo de moléculas desponta como uma importante classe fitoquímica amplamente distribuída na natureza e que apresenta diversos efeitos farmacológicos, tais como anticâncer (KLENKAR; MOLNAR, 2015), anticoagulante (HELGELAND, 1980), anti-inflamatória (GARCÍA-ARGÁEZ *et al.*, 2000), antioxidante (GACCHE, JADHAV, 2012) e antimicrobiana (KAYSER; KOLODZIEJ, 1999).

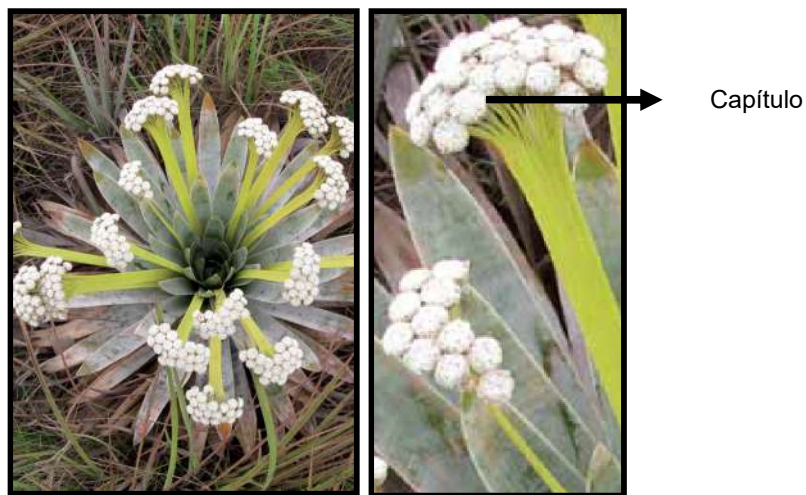
#### Paepalantina e 8,8' dímero de paepalantina

O Brasil tem a maior diversidade vegetal do mundo, com um número estimado de mais de 20% do total de espécies do planeta. Com mais de 50 mil espécies descritas, esta rica biodiversidade é acompanhada por uma ampla aceitação do uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado. Cerca de 48% dos medicamentos utilizados na terapêutica são originados direta ou indiretamente a partir de produtos naturais, especialmente plantas medicinais (LIMA *et al.*, 2016).

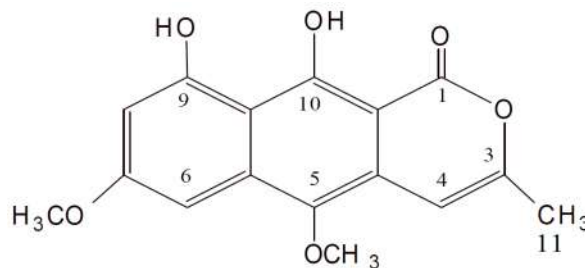
*Eriocaulaceae* é uma pequena família de plantas com flores, as quais contêm cerca de 1.400 espécies agrupadas em 11 gêneros. A maioria das espécies incluídas nesta família é distribuída em regiões montanhosas da América do Sul (ALVARADO *et al.*, 2013). *Paepalanthus*, com cerca de 500 espécies, é um dos seus

principais gêneros, os quais são comumente encontrados no Brasil, principalmente nos estados da Bahia e Minas Gerais. Estudos demonstraram que quase todas as espécies de *Paepalanthus*, subgênero *Platycaulon* possuem flavonóides, naftoquinonas, derivados de ácido caféico e naftopiranonas, incluindo paepalantina e dímero 8,8'-paepalantina (DAMASCENO *et al.*, 2015; KITAGAWA *et al.*, 2015).

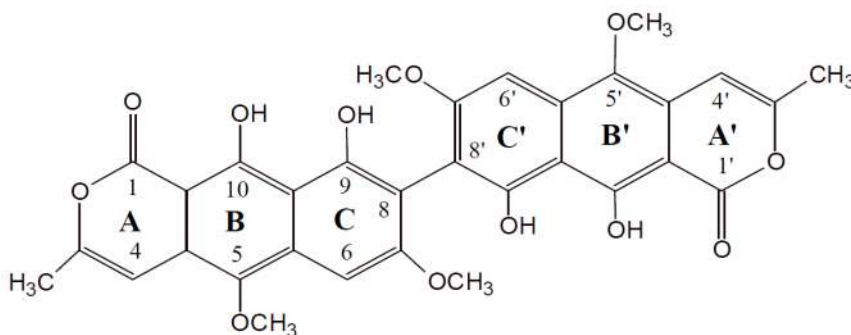
Dentre as cumarinas, as isocumarinas paepalantina (Figura 13) e dímero 8,8'-paepalantina (Figura 14) possuem grande interesse farmacológico, por apresentarem atividade biológica comprovada. Paepalantina é uma isocumarina (9,10-diidroxí-5,7-dimetoxi-1H-nafto(2,3c)piran-1-ona), a qual foi isolada pela primeira vez em 1990 a partir de capítulos florais de *P. bromelioides* (*Eriocaulaceae*) (Figura 12) (Vilegas *et al.*, 1990). Posteriormente, o dímero de paepalantina foi também isolado a partir de capítulos florais de *P. bromelioides* por Coelho e colaboradores em 2000, através de procedimentos cromatográficos (COELHO *et al.*, 2000). Esses compostos, por possuírem estrutura semelhante a outros compostos e fármacos antibacterianos, tais como a vioxantina, são de grande interesse em pesquisas para desenvolvimento de novos fármacos (COELHO *et al.*, 2000).



**Figura 12:** *Paepalanthus bromelioides*. Fonte: MARGARET *et al.* (2012).



**Figura 13:** Estrutura química da paepalantina. Fonte: adaptado de VILEGAS *et al.*, (1990).



**Figura 14:** Estrutura química do 8,8' dîmero de paepalantina. Fonte: adaptado de COELHO *et al.*, (2000).

No estudo de Vilegas (1990) a paepalantina foi testada em relação a sua atividade antimicrobiana e fungicida. Foi demonstrado, através da técnica de difusão em ágar e diluição em caldo, que paepalantina possui atividade contra todas as bactérias testadas no estudo (*Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 25922) e inatividade contra fungos (VILEGAS *et al.*, 1990).

Por tudo exposto acima, produtos naturais derivados de plantas surgem como potenciais alternativas aos fármacos já utilizados ou mesmo como agentes para a ação sinérgica, possibilitando que antibacterianos já ineficazes sejam novamente eficientes quando associados a extratos ou substâncias purificadas de plantas (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar a atividade *in vitro* da paepalantina e do dímero de paepalantina isoladamente e em associação com diferentes antibacterianos sobre bactérias multirresistentes isoladas de hospitais da Grande Vitória - Espírito Santo.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração mínima inibitória da paepalantina e do dímero frente as seguintes bactérias multirresistentes: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Determinar a atividade da associação da paepalantina e do dímero com a vancomicina frente às amostras de *E. faecium*;
- Determinar a atividade da associação da paepalantina e do dímero com oxacilina frente às amostras de *S. aureus*;
- Determinar a atividade da associação da paepalantina e do dímero com meropenem frente às amostras de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*;
- Avaliar, por microscopia eletrônica de varredura, possíveis alterações morfológicas e estruturais nas amostras bacterianas expostas a concentrações inibitórias e subinibitórias da paepalantina e do dímero isoladamente e em associação com os antibacterianos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo sob parecer nº 707.303 de 30/07/2014.

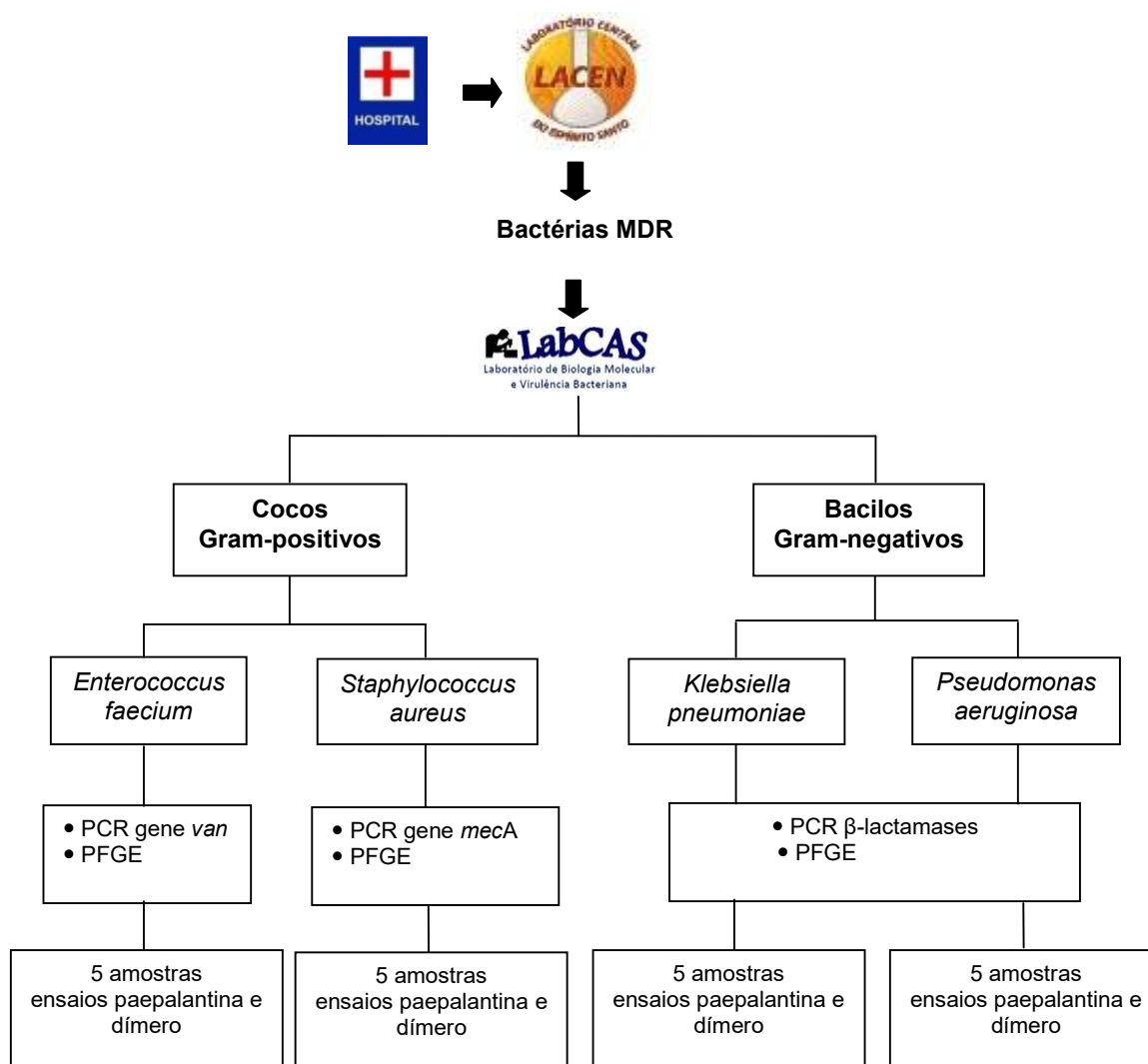
### **4.2 Amostras bacterianas**

Os micro-organismos do presente estudo pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana, do Departamento de Patologia - UFES, e foram isolados durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa “Epidemiologia molecular e investigação de genes de resistência em bactérias multirresistentes isoladas em hospitais da Grande Vitória”, financiado pelo EDITAL CNPQ/MS-Decit/SESA/FAPES N° 10/2013 – PPSUS e realizado em colaboração com o Laboratório Central do Espírito Santo (LACEN-ES) da Secretária Estadual de Saúde.

Os critérios utilizados para a seleção das amostras foram: (a) ser MDR, (b) apresentar variação genética entre cepas de cada espécie.

Micro-organismos multirresistentes (MDR) foram definidos como aqueles resistentes a pelo menos um agente de três ou mais classes de antibacterianos, de acordo com MAGIORAKOS *et al.* (2012).

O fluxograma para a seleção das amostras neste trabalho seguiu o padrão descrito na Figura 15.



**Figura 15:** Fluxograma do processo de seleção das amostras utilizadas para este estudo.

Assim, foram selecionados 20 isolados clínicos, sendo cinco amostras de cada uma das seguintes espécies: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, originadas de diferentes hospitais da Grande Vitória-ES, com resistência aos carbapenêmicos (*K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*), resistência a oxacilina (*S. aureus*) e resistência à vancomicina (*E. faecium*). As características fenotípicas e genotípicas desses isolados estão resumidas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Características fenotípicas e genotípicas das amostras utilizadas neste estudo.

Micro-organismo	Identificação da amostra	CMI	Características genotípicas	
			Pulsotipo *	Genes de resistência
<i>Enterococcus faecium</i>	04E	Vancomicina > 256 µg/mL	efA1	<i>vanA</i>
	12E		efA2	<i>vanA</i>
	13E		efA3	<i>vanA</i>
	56E		efB1	<i>vanA</i>
	58E		efB2	<i>vanA</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	02A	Oxacilina 32 µg/mL	saA	SCC <i>mec</i> II
	04A	Oxacilina 32 µg/mL	saB	SCC <i>mec</i> IV
	20A	Oxacilina 16 µg/mL	saC	SCC <i>mec</i> IV
	72A	Oxacilina 16 µg/mL	saD	SCC <i>mec</i> IV
	77A	Oxacilina 64 µg/mL	saE	SCC <i>mec</i> IV
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	05B	Meropenem > 32 µg/mL	kpA	KPC, CTX-M gr1
	10B		kpB	KPC, SHV, OXA1-Like, CTX-M gr1
	17B		kpC	KPC, SHV
	89B		kpD	KPC, TEM, SHV, OXA1-Like, CTX-M gr1
	91B		kpE	KPC, TEM, SHV
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	01B	Meropenem > 32 µg/mL	psA	
	07B		psB	
	34B		psC	ND**
	39B		psD	
	66B		psE	

\* pulsotipo obtido pela técnica de fragmentação do DNA cromossômico com enzima de restrição e posterior eletroforese de campo pulsado (PFGE); CMI: concentração mínima inibitória \*\* - Não determinado.

### 4.3 Obtenção da paepalantina e do dímero.

Ambas as substâncias foram obtidas de *P. bromelioides* coletada na Serra do Cipó, em Minas Gerais e catalogada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), sob referência CFSC 13.846. Após a coleta, toda a preparação dos extratos brutos, fracionamentos e purificações foram realizados segundo Vilegas *et al.* (1990) para a paepalantina e Coelho *et al.* (2000) para o dímero. Assim, após os processos supracitados, as substâncias foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rodrigo Resende Kitagawa, coordenador do Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFES.



#### 4.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) pela técnica de microdiluição em caldo

A avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços e fundo em “U” (Nest Biotech Co.), de acordo com a metodologia descrita no documento M07-A10 do manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). O meio de cultura utilizado foi o caldo Mueller-Hinton (MH) cátion ajustado (Fluka Analytical®), de acordo com as recomendações do CLSI.

Os isolados bacterianos foram cultivados em ágar contendo 5% de sangue de carneiro (AS) por 18-24 horas a 35°C. A partir desse crescimento bacteriano, foi preparada uma suspensão em solução de NaCl 0,9% (p/v) equivalente a escala 0,5 de McFarland ( $\sim 1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Essa suspensão foi diluída 1:20 em solução de NaCl 0,9% (p/v). Diluições seriadas (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg/mL) dos antibacterianos (meropenem, oxacilina e vancomicina) e as substâncias (paepalantina e dímero) foram previamente efetuadas com caldo Mueller Hinton. A cada poço da placa foram dispensados 180 µL de cada concentração dos antibacterianos/substâncias e inoculado 20 µL da suspensão bacteriana previamente diluída 1:20 (contendo  $5 \times 10^6$  UFC/mL). Em cada poço, o volume final foi de 200 µL e a concentração bacteriana de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Os testes foram efetuados em duplicata e acompanhados dos controles de crescimento. A placa foi submetida à leitura espectrofotométrica em 630 nm e, a seguir, incubada em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas.

A inibição do crescimento bacteriano foi demonstrada por densidade óptica (DO) utilizando o leitor Thermo Plate (TP READER®) em um comprimento de onda de 630 nm. Considerando o crescimento total (100%) no controle (caldo MH + suspensão bacteriana), o percentual de redução do crescimento foi atribuído aos poços restantes. A CMI foi definida como sendo a menor concentração de antibacteriano/substâncias que inibe 90% ou mais o crescimento bacteriano em relação ao controle não tratado (MIYASAKI *et al.*, 2013). Os pontos de corte utilizados para os antibacterianos foram baseados nos critérios estabelecidos pelo CLSI 2015 (Tabela 5).

**Tabela 5:** Padrões interpretativos para determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Antibacteriano (micro-organismo)	Padrão interpretativo ( $\mu\text{g/mL}$ )*		
	sensível	intermediário	resistente
Meropenem ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	$\leq 2,0$	4,0	$\geq 8,0$
Meropenem ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	$\leq 1,0$	2,0	$\geq 4,0$
Vancomicina ( <i>Enterococcus faecium</i> )	$\leq 4,0$	8,0 - 16,0	$\geq 32,0$
Oxacilina ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	$\leq 2,0$	–	$\geq 4,0$

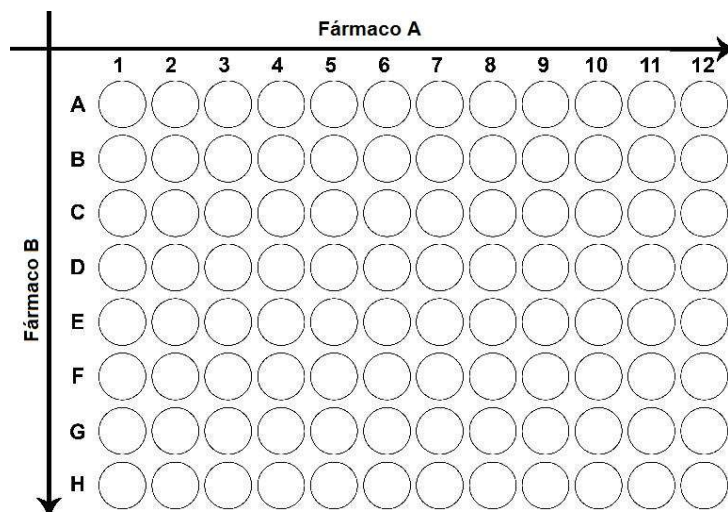
\* Segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015)

#### 4.4.1 Controle de qualidade

Cepas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC<sup>®</sup>) *Staphylococcus aureus* 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* 27853 foram utilizadas para o controle de qualidade dos antibacterianos, conforme preconizado pelo CLSI (2015).

#### 4.5 Avaliação da atividade, através do método de *checkerboard*, da associação da paepalantina e do dímero com os agentes antibacterianos

O termo *checkerboard* refere-se ao padrão formado por várias diluições dos dois fármacos a serem testados, em diferentes concentrações, geralmente abaixo de suas CMIs. O *checkerboard* consiste em colunas contendo o fármaco A, diluída ao longo do eixo x, e linhas contendo o fármaco B, diluída ao longo do eixo y. Assim, em cada poço, teremos uma combinação única de concentrações entre as duas substâncias (Figura 16) (PILLAI, MOELLERING, ELIOPOULOS, 2005).



**Figura 16:** Representação da metodologia do ensaio de associação entre substâncias pela técnica de *checkerboard*.

O estudo da associação entre paepalantina/dímero e os antibacterianos foi realizado através da técnica de *checkerboard*, conforme descrito por PILLAI, MOELLERING, ELIOPOULOS (2005). Foram selecionados os antibacterianos (Tabela 6) que eram comumente empregados no tratamento de infecções provocadas pelos micro-organismos *S. aureus*, *E. faecium*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, mas que ao longo dos últimos anos vem sendo cada vez mais comum o isolamento de cepas resistentes a eles com conseqüente redução no seu uso.

**Tabela 6:** Antibacterianos utilizados nos ensaios de *checkerboard*

Micro-organismo	Antibacteriano
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Oxacilina
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Meropenem
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Meropenem

As diluições dos antibacterianos e das substâncias foram realizadas em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado, em concentrações previamente determinadas e baseadas nos valores de CMI. As concentrações de ambas as substâncias variaram de CMI/2 até 0,0625 µg/mL, com exceção de *Enterococcus*, cujas CMIs de vancomicina foram superiores a 256 µg/mL e a variação utilizada foi de 32 a 0,0625

µg/mL, três vezes o valor do limite de sensibilidade estabelecido pelo CLSI. O processo de diluição e preparo da suspensão bacteriana, ocorreu conforme descrito no item 4.4.

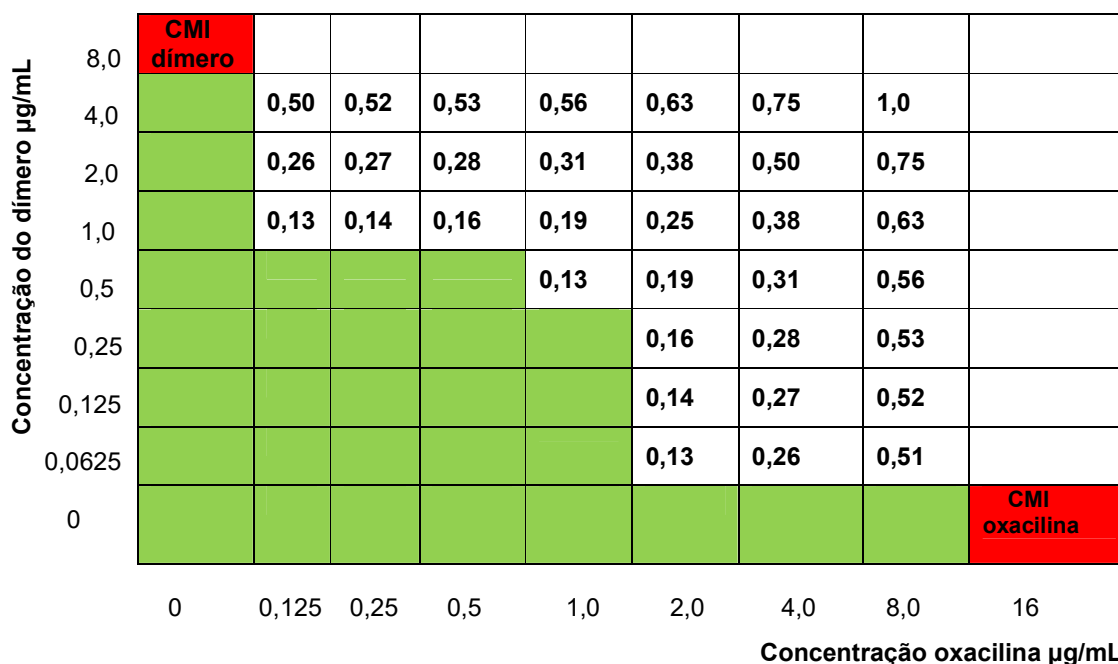
Em uma placa de microtitulação, 90 µL de cada diluição foram distribuídas ao longo da mesma, na seguinte ordem: na vertical: concentração diluída de cima para baixo do antibacteriano A, e na horizontal: 90 µL da substância (B) diluído da esquerda para a direita. Em seguida, cada poço foi inoculado com 20 µL da suspensão bacteriana contendo  $5 \times 10^6$  UFC/mL. As placas com as diferentes combinações de antibacterianos/substâncias e controle de crescimento foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24h. A leitura foi realizada visualmente, em local iluminado, observando-se a turvação macroscópica visível.

Para a interpretação do resultado para o efeito sinérgico da associação do antibacteriano e substâncias, foi realizado um cálculo através do somatório dos índices de concentração inibitória fracional (*Fractional Inhibitory Concentration Index* – IFIC). Para isso, primeiramente, foram realizados os cálculos de CIF para cada composto testado, seguido do cálculo da soma de índice CIF ( $\sum$ CIF) para cada combinação, de acordo com a equação:

$$\frac{A}{CMI_A} + \frac{B}{CMI_B} = CIF_A + CIF_B = ICIF$$

**A** = CMI substância A em associação; **CMI<sub>A</sub>** = CMI da substância A testada isoladamente; **B** = CMI substância B em associação; **CMI<sub>B</sub>** = CMI da substância B testada isoladamente; **CIF** = concentração inibitória fracionada; **ICIF** = índice da concentração inibitória fracional. Fonte: PILLAI, MOELLERING, ELIOPOULOS (2005).

Com objetivo de facilitar a compreensão dos valores obtidos no ensaio *checkerboard*, a Figura 17 ilustra um exemplo com crescimento de MRSA (cor verde). Os ICIF foram calculados para as concentrações de dímero em associação com oxacilina.



**Figura 17:** Representação do método de *checkerboard*, demonstrando a associação entre o dímero de paepalantina e a oxacilina em uma amostra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. Fonte: Adaptado de PANÁČEK *et al.* (2016).

$$CIF = \frac{CMI_{\text{dímero em associação}}}{CMI_{\text{dímero sozinho}}} + \frac{CMI_{\text{oxacilina em associação}}}{CMI_{\text{oxacilina sozinho}}} = CIF_A + CIF_B$$

$$ICIF = \frac{1}{8} + \frac{0,125}{16} = 0,125 + 0,007 = 0,13$$

Foram calculados os valores de ICIF de todas as combinações que não apresentaram crescimento bacteriano. O selecionado foi o que apresentou menor valor dentro da faixa de susceptibilidade do antibacteriano, segundo critérios do CLSI. No exemplo acima a associação utilizada de dímero/oxacilina foi 1,0/0,125 cuja ICIF foi 0,13.

Para interpretação dos cálculos, ODDS (2003) sugeriu os seguintes intervalos para classificação da associação entre substâncias no método de *checkerboard*: ICIF ≤ 0,5 sinérgico; ICIF >0,5 < 4 indiferente; ICIF > 4 antagonismo. No exemplo demonstrado na Figura 17, o resultado da associação dímero/oxacilina foi sinérgico (ICIF 0,13).

#### **4.6 Avaliações da morfologia bacteriana por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

No preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura, o meio de cultura contendo as bactérias do estudo foram aliqüotados e centrifugados a 2348 xg por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida adicionado 500uL do tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 para lavagem com posterior centrifugação. Ao pellet formado foram adicionados 500 µL do fixador tamponado (glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2) por 24 horas. Após o período de fixação, o material foi lavado com água ultrapura e desidratado com uma série crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), entre cada umas dessas etapas a centrifugação foi realizada para retirada do excesso de solvente (2348 xg por 2 minutos).

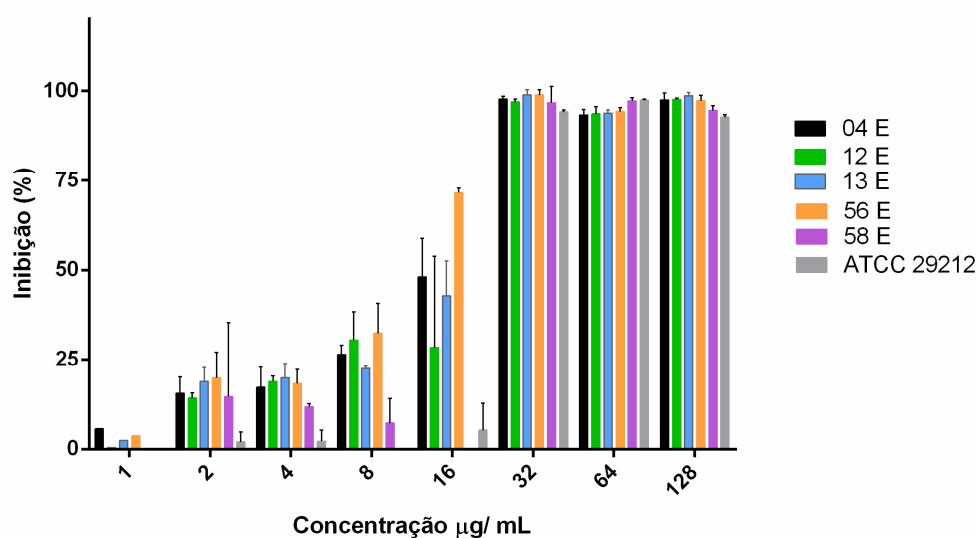
Após a completa desidratação do material, 10 µL do material foram gotejados em uma lamínula de vidro e levado para secagem em ponto crítico (Autosandri-815, Tousimis) e posterior cobertura de ouro em metalizador (Desk V, Denton Vacuum). As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, do Departamento de Morfologia da UFES.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Atividade da paepalantina e do dímero no crescimento bacteriano

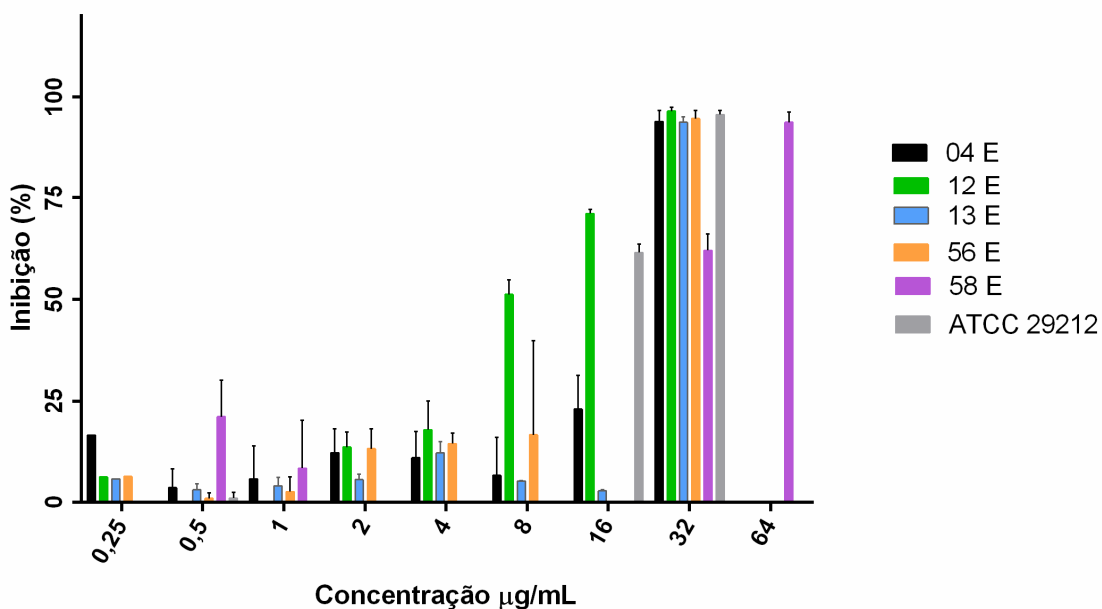
#### *Enterococcus faecium*

As concentrações testadas de paepalantina variaram de 128 a 1,0  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as cinco amostras apresentaram inibição do crescimento na concentração de 32  $\mu\text{g/mL}$  de paepalantina (Figura 18).



**Figura 18:** Inibição do crescimento de *Enterococcus faecium* frente a paepalantina nas concentrações de 128 a 1,0  $\mu\text{g/mL}$ .

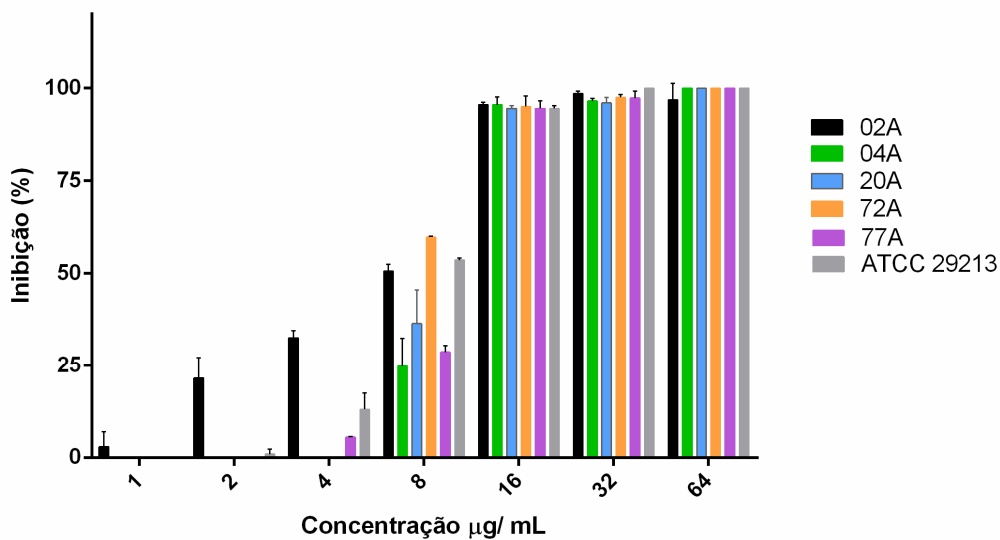
Em relação ao dímero, as concentrações testadas variaram de 64 a 0,125  $\mu\text{g/mL}$ . Assim sendo, as amostras 04E, 12E, 13E e 56E apresentaram inibição de crescimento na concentração de 32  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto a amostra 58E, foi inibida na concentração de 64  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 19).



**Figura 19:** Inibição do crescimento de *Enterococcus faecium* frente ao dímero nas concentrações de 64 a 0,25 µg/mL.

### *Staphylococcus aureus*

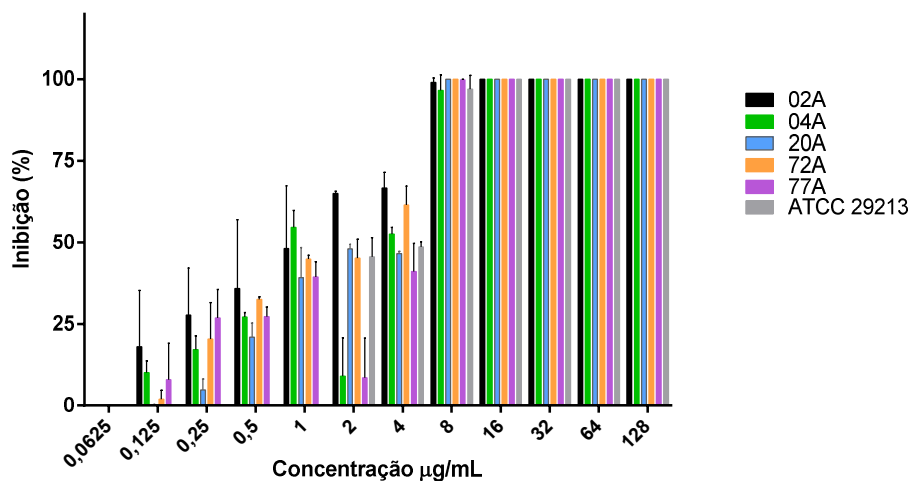
As concentrações testadas de paepalantina variaram de 64 a 1,0 µg/mL. Todas as cinco amostras de MRSA apresentaram inibição de crescimento na concentração de 16 µg/mL (Figura 20).



**Figura 20:** Inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* frente a paepalantina nas concentrações de 64 a 1,0 µg/mL.



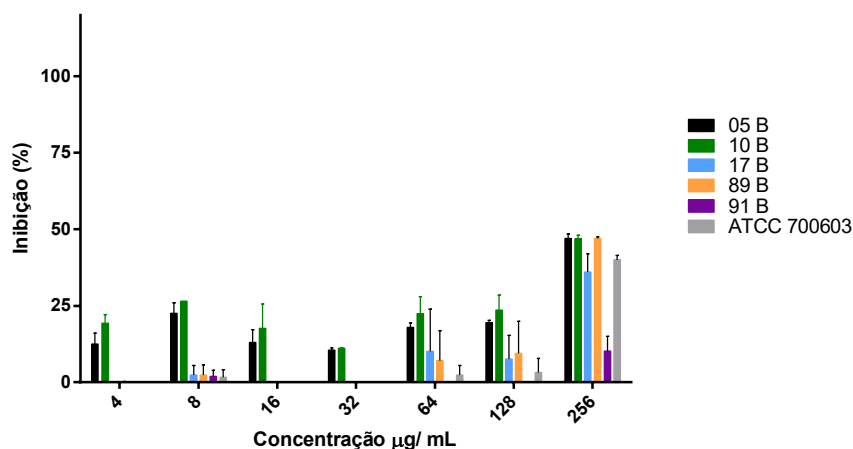
Em relação ao dímero, as concentrações testadas variaram de 128 a 0,0625  $\mu\text{g/mL}$  e todas as cinco amostras foram inibidas na concentração de 8,0  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 21).



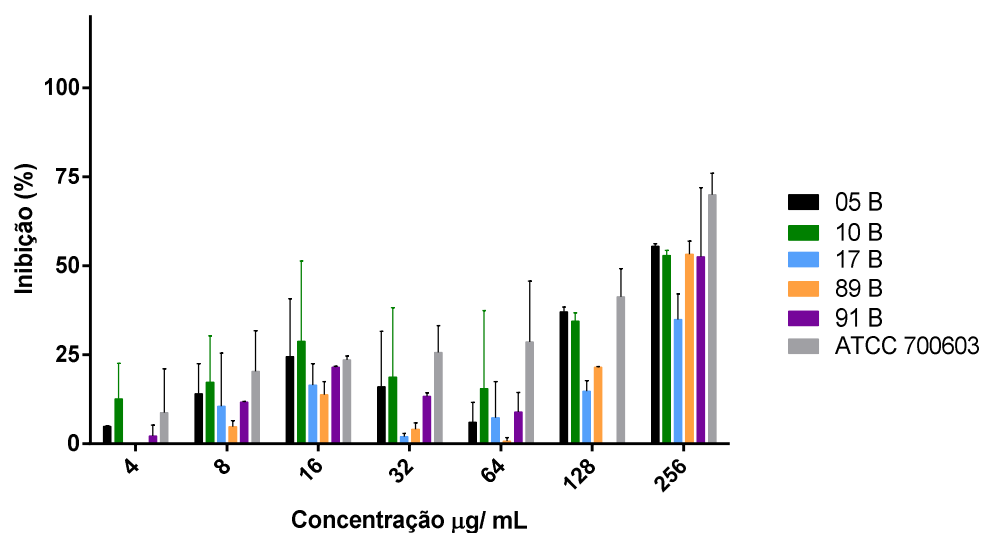
**Figura 21:** Inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* frente a dímero nas concentrações de 128 a 0,0625  $\mu\text{g/mL}$ .

### *Klebsiella pneumoniae*

Todas as amostras de *K. pneumoniae* cresceram em concentrações de 256  $\mu\text{g/mL}$  de paepalantina e dímero. Desse modo, os resultados mostram o baixo potencial antibacteriano da paepalantina e do dímero frente as amostras testadas (Figuras 22 e 23).



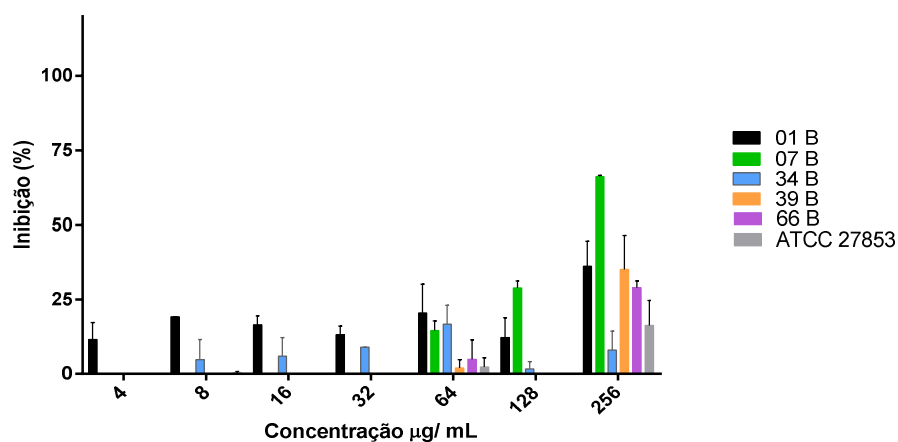
**Figura 22:** Inibição do crescimento de *Klebsiella pneumoniae* frente a paepalantina nas concentrações de 256 a 4,0  $\mu\text{g/mL}$ .



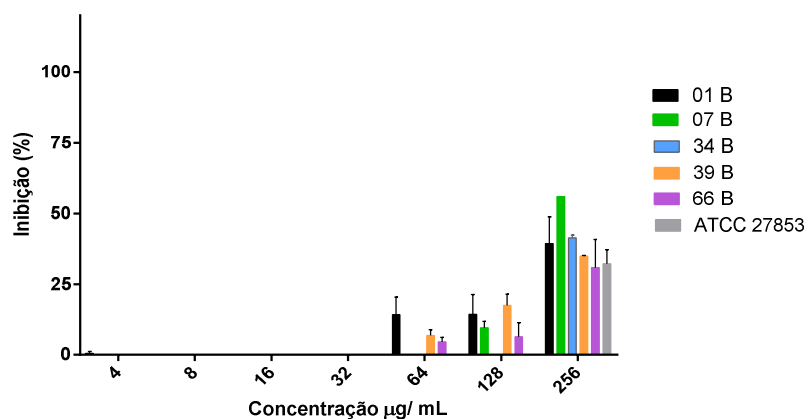
**Figura 23:** Inibição do crescimento de *Klebsiella pneumoniae* frente a dímero nas concentrações de 256 a 4,0 µg/mL.

### *Pseudomonas aeruginosa*

Assim como ocorreu nas amostras de *K. pneumoniae*, a concentração de 256 µg/mL não inibiu o crescimento das amostras de *P. aeruginosa*, mostrando o baixo potencial antibacteriano da paepalantina e dímero também frente a essas amostras (Figuras 24 e 25).



**Figura 24:** Inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* frente a paepalantina nas concentrações de 256 a 4,0 µg/mL.



**Figura 25:** Inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* frente a dímero nas concentrações de 256 a 4,0 µg/mL.

Após a análise dos gráficos, os valores de CMIs obtidos para cada substância estão descritos na Tabela 7.

**Tabela 7:** Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos antibacterianos, paepalantina e dímero.

Micro-organismo	Amostra	CMI µg/mL		
		vancomicina	paepalantina	dímero
<i>Enterococcus faecium</i>	04E		32	32
	12E		32	32
	13E	>256	32	32
	56E		32	32
	58E		32	64
Micro-organismo	Amostra	CMI µg/mL		
		oxacilina	paepalantina	dímero
<i>Staphylococcus aureus</i>	02A	32	16	8
	04A	32	16	8
	20A	16	16	8
	72A	16	16	8
	77A	64	16	8
Micro-organismo	Amostra	CMI µg/mL		
		meropenem	paepalantina	dímero
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	05B	32		
	10B	32		
	17B	32	> 256	>256
	89B	32		
	91B	32		
Micro-organismo	Amostra	CMI µg/mL		
		meropenem	paepalantina	dímero
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	01B	32		
	07B	32		
	34B	32	> 256	> 256
	39B	32		
	66B	32		

## 5.2 Análise da atividade da associação entre a paepalantina e o dímero com os antibacterianos.

### *Enterococcus faecium*

Quando foram analisadas as associações da paepalantina e o dímero com a vancomicina nas diferentes concentrações foi observado efeito indiferente para as cinco amostras de VRE. Todas apresentaram valores de ICIF > 0,5 (Tabela 8).

**Tabela 8:** Resultados da associação *in vitro* entre vancomicina/paepalantina e vancomicina/dímero nas amostras de *Enterococcus faecium*

Amostra	Substância	CMI µg/mL		CIF	ICIF	Tipo de associação
		combinado	sozinho			
04E	vancomicina	32	256	0,13	0,63	indiferente
	paepalantina	16	32	0,50		
	vancomicina	32	256	0,13	0,63	indiferente
	dímero	16	32	0,50		
12E	vancomicina	32	256	0,13	0,63	indiferente
	paepalantina	16	32	0,50		
	vancomicina	4	256	0,02	0,52	indiferente
	dímero	16	32	0,50		
13E	vancomicina	32	256	0,13	0,63	indiferente
	paepalantina	16	32	0,50		
	vancomicina	32	256	0,13	0,63	indiferente
	dímero	16	32	0,50		
56E	vancomicina	32	256	0,13	0,63	indiferente
	paepalantina	16	32	0,50		
	vancomicina	4	256	0,02	0,52	indiferente
	dímero	16	32	0,50		
58E	vancomicina	32	256	0,13	0,63	indiferente
	paepalantina	16	32	0,50		
	vancomicina	4	256	0,02	0,52	indiferente
	dímero	32	64	0,50		

CMI - concentração mínima inibitória;

CIF - concentração inibitória fracional;

ICIF - índice da concentração inibitória fracional

### *Staphylococcus aureus*

O efeito da associação da paepalantina/oxacilina foi indiferente em três amostras (02A, 04A e 20A), com o ICIF acima de 0,5. Entretanto, o efeito da associação da paepalantina/oxacilina foi sinérgico na amostra 72A (ICIF 0,13), onde

a CMI da oxacilina passou de 16 µg/mL para 2 µg/mL e na amostra 77A (ICIF 0,25), a CMI da oxacilina passou de 64 para 16 µg/mL.

**Tabela 9:** Resultados da associação *in vitro* entre oxacilina/paepalantina e oxacilina/dímero para *Staphylococcus aureus*

Amostra	Substância	CMI µg/mL		CIF	ICIF	Tipo de associação
		combinado	sozinho			
02A	oxacilina	16	32	0,50	1,00	indiferente
	paepalantina	8	16	0,50		
	oxacilina	0,125	32	0,00	0,50	sinergismo
	dímero	4	8	0,50		
04A	oxacilina	16	32	0,50	1,00	indiferente
	paepalantina	8	16	0,50		
	oxacilina	2	32	0,06	0,31	sinergismo
	dímero	2	8	0,25		
20A	oxacilina	8	16	0,50	1,00	indiferente
	paepalantina	8	16	0,50		
	oxacilina	0,125	16	0,00	0,13	sinergismo
	dímero	1	8	0,13		
72A	oxacilina	2	16	0,13	0,13	sinergismo
	paepalantina	0,0625	16	0,00		
	oxacilina	0,125	16	0,00	0,13	sinergismo
	dímero	1	8	0,13		
77A	oxacilina	16	64	0,25	0,25	sinergismo
	paepalantina	0,0625	16	0,00		
	oxacilina	0,5	64	0,00	0,25	sinergismo
	dímero	2	8	0,25		

CMI - concentração mínima inibitória;  
 CIF - concentração inibitória fracional;  
 ICIF - índice da concentração inibitória fracional

Resultados mais expressivos foram encontrados em relação ao dímero associado à oxacilina. Todas as amostras testadas apresentaram sinergismo, com ICIF < 0,5. Nas amostras 02A, 20A e 72A, as CMI da oxacilina passaram de 32 µg/mL, 16 µg/mL e 16 µg/mL respectivamente, para 0,125 µg/mL; na amostra 04A, a CMI da oxacilina passou de 32 µg/mL para 2 µg/mL e na amostra 77A, a CMI da oxacilina passou de 64 µg/mL a 0,5 µg/mL.

A Tabela 9 apresenta um resumo da associação *in vitro* entre oxacilina/paepalantina e oxacilina/dímero para as amostras de MRSA.

*Klebsiella pneumoniae*

Quando foram analisadas as associações da paepalantina e o dímero com o meropenem nas diferentes concentrações o tipo de associação entre eles foi indiferente, com ICIF > 0,5 (Tabela 10). Para nenhuma amostra foi observada associação sinérgica ou antagônica.

**Tabela 10:** Resultado da associação *in vitro* entre meropenem/paepalantina e meropenem/dímero frente a *Klebsiella pneumoniae*

Amostra	Substância	CMI µg/mL		CIF	ICIF	Tipo de associação
		combinado	sozinho			
05B	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	paepalantina	32	256	0,13		
	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	dímero	32	256	0,13		
10B	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	paepalantina	32	256	0,13		
	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	dímero	32	256	0,13		
17B	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	paepalantina	32	256	0,13		
	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	dímero	32	256	0,13		
89B	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	paepalantina	32	256	0,13		
	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	dímero	32	256	0,13		
91B	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	paepalantina	32	256	0,13		
	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	dímero	32	256	0,13		

CMI - concentração mínima inibitória;

CIF - concentração inibitória fracional;

ICIF - índice da concentração inibitória fracional

*Pseudomonas aeruginosa*

Assim como ocorreu para *K. pneumoniae*, quando foram analisadas as associações da paepalantina e do dímero com o meropenem nas diferentes concentrações, as mesmas foram caracterizadas como indiferentes, com ICIF > 0,5 (Tabela 11).

**Tabela 11:** Resultado da associação *in vitro* entre meropenem/paepalantina e meropenem/dímero nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

Amostra	Substância	CMI µg/mL		CIF	ICIF	Tipo de associação
		combinado	sozinho			
01B	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	paepalantina	32	256	0,13		
	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	dímero	32	256	0,13		
07B	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	paepalantina	32	256	0,13		
	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	dímero	32	256	0,13		
34B	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	paepalantina	32	256	0,13		
	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	dímero	32	256	0,13		
39B	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	paepalantina	32	256	0,13		
	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	dímero	32	256	0,13		
66B	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	paepalantina	32	256	0,13		
	meropenem	32	32	1,00	1,13	indiferente
	dímero	32	256	0,13		

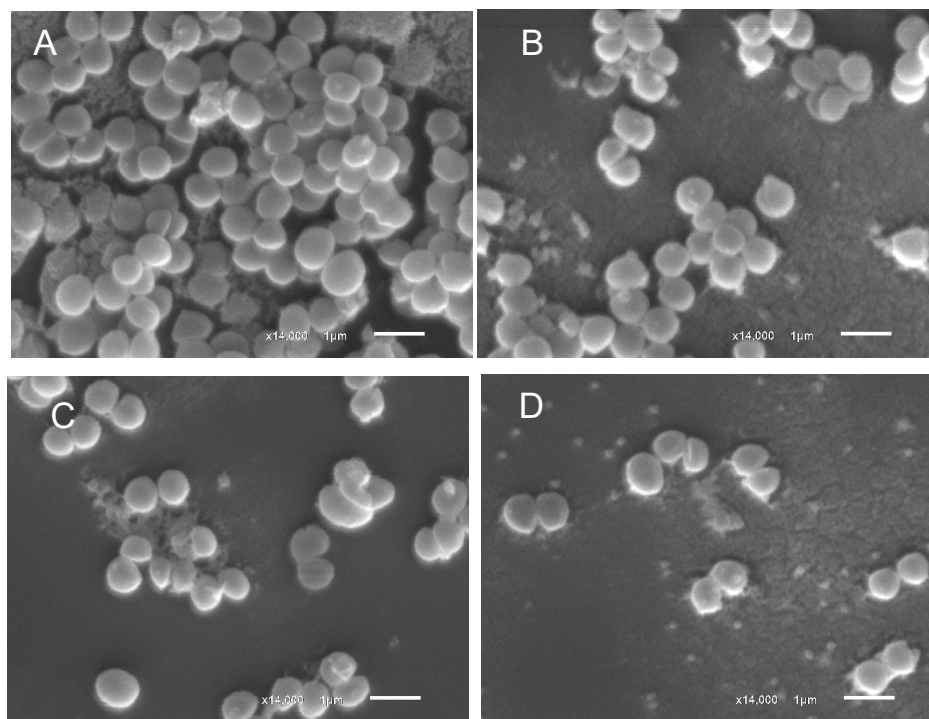
CMI - concentração mínima inibitória;  
 CIF - concentração inibitória fracional;  
 ICIF - índice da concentração inibitória fracional

### 5.3 Avaliação da estrutura bacteriana por microscopia eletrônica de varredura em *S. aureus*

Uma vez que estudos prévios de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a paepalantina alteram a estrutura celular de *Helicobacter pylori* (DAMASCENO, 2016), realizamos a seleção de amostras de *S. aureus* para a verificação se essas

as substâncias também causariam alterações estruturais nesta espécie. A seleção dessa espécie se deu devido aos melhores resultados obtidos durante a avaliação da ação da paepalantina e do dímero, tanto isoladamente quanto em associação com o antibacteriano testado, neste caso oxacilina, terem ocorridos com esse micro-organismo,

Foram realizadas imagens dos *S. aureus* após tratamento com paepalantina (8  $\mu\text{g/mL}$ ) e dímero (4  $\mu\text{g/mL}$ ) isoladamente e da associação da oxacilina com o dímero (16  $\mu\text{g/mL}$  e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) no tempo de 24 horas. Amostra controle sem tratamento foi analisada para fins comparativos. Foi observada morfologia celular intacta, algumas células no estágio de divisão, sem lise celular, um pouco de material amorfo, nas diferentes condições descritas na Figura 26. Assim, através desse método, não foi possível detectar qualquer alteração estrutural externa nas bactérias sobre ação das substâncias.



**Figura 26:** Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia do *Staphylococcus aureus*. (A) amostra controle; (B) amostra tratada com 4  $\mu\text{g/mL}$  de dímero; (C) amostra tratada com 8  $\mu\text{g/mL}$  de paepalantina; (D) amostra tratada com 16  $\mu\text{g/mL}$  de oxacilina e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de dímero. Magnificação de 10.000X e *scale bar* de 1 $\mu\text{m}$ .



## 6 DISCUSSÃO

No cenário atual, as doenças infecciosas continuam sendo uma das principais causas de mortalidade entre crianças e adultos em todo o mundo, com maior prevalência nos países em desenvolvimento. Embora alguns novos antibacterianos tenham sido produzidos nos últimos anos, existe um aumento drástico de bactérias resistentes a múltiplos fármacos (DZOTAM; TOUANI; KUETE, 2016). Bactérias multirresistentes, tais como: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus* spp resistente à vancomicina (VRE), *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e membros da família *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp. produtores de carbapenemases, são considerados emergências em termos de saúde pública, com impacto na morbimortalidade, tempo de internação e gastos com procedimentos diagnósticos e terapêuticos (GARCIA *et al.*, 2013; BASAK; SINGH; RAJURKAR, 2016). Esse quadro levou pesquisadores em todo o mundo a explorarem as propriedades medicinais de extratos de plantas que podem servir como fontes de agentes antibacterianos contra uma ampla gama de bactérias (Gram-negativas e Gram-positivas) e fungos (JIMENEZ-ARELLANES *et al.*, 2003; TAWEECHASUPAPONG *et al.*, 2012). As plantas contêm metabólitos ativos que podem servir como fonte alternativa no tratamento de várias doenças infecciosas (COWAN, 1999). Assim, vários metabólitos secundários de plantas podem ser utilizados como solução alternativa para o tratamento de muitas doenças infecciosas e/ou potencializarem a atividade de antibacterianos comumente utilizados na prática clínica (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Detentor de rica biodiversidade, o Brasil é considerado um dos países megadiversos mais importantes do planeta. Sendo uma das mais ricas do planeta, a biodiversidade brasileira contém muitas plantas com propriedades antibióticas. Porém, essas espécies vêm sofrendo exploração irracional visto que grande parte dos fitoterápicos é retirada do caule e da raiz das plantas, o que pode ser uma séria ameaça às populações (MELO; AMORIM; ALBUQUERQUE, 2008). A exploração sustentável de plantas medicinais incluiria medidas como a exploração de partes naturalmente renováveis como folhas e partes de frutos, que deveriam ser mais amplamente estudados (PINHO *et al.*, 2012).

Plantas da família *Eriocaulaceae* são difundidas em regiões tropicais do mundo inteiro. Várias plantas dessa família são conhecidas como 'sempre vivas', devido aos capítulos e escapos permanecerem com aparência de vivos durante muitos anos, mesmo após o corte. Seu comércio baseia-se, sobretudo, no extrativismo das populações *in situ*, o que, associado ao alto grau de endemismo das espécies, contribui para que muitas sejam consideradas ameaçadas de extinção (MARGARET *et al.*, 2012). *Paepalanthus* é o maior gênero desta família com várias espécies. No Brasil, a maior diversidade do gênero encontra-se na Cadeia do Espinhaço, sendo que aproximadamente 82% são endêmicas desta formação geológica (COSTA; TROVÓ; SANO, 2008). O potencial biológico dos metabólitos produzidos por essas plantas foi demonstrado por diversos estudos: atividade antirradicalar (AMARAL *et al.*, 2012; AMORIM *et al.*, 2014), citotóxica (DEVIENCE *et al.*, 2002; KITAGAWA *et al.*, 2004), antiúlcera (BATISTA *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2006), mutagênica (VARANDA *et al.*, 2006; ZANUTTO *et al.*, 2012), antimicrobiana (VILEGAS *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2013; DAMASCENO, 2016), anti-inflamatória (DI STASI *et al.*, 2004).

Para avaliar combinações da atividade sinérgica de diferentes substâncias *in vitro*, o método de *checkerboard* é a técnica que tem sido utilizada com maior frequência. Para interpretar o resultado da associação farmacodinâmica entre substâncias, existem definições qualitativas, denominadas sinergismo e antagonismo. O sinergismo é uma interação positiva, onde o efeito combinado dos fármacos é significativamente maior que o efeito independente destes quando utilizados separadamente. Antagonismo é uma interação negativa, onde o efeito dos fármacos combinados é significativamente menor do que quando não combinados. Quando não há interação significativa entre os fármacos testados, esse resultado deve ser descrito como indiferente (PILLAI, MOELLERING, ELIOPOULOS, 2005).

Ensaio *in vitro* com paepalantina indicaram forte atividade antimicrobiana contra amostras-padrão ATCC de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (VILEGAS *et al.*, 1990). Dentre seis isocumarinas naturais e semi-sintéticas avaliadas por Devienne (2000), apenas a paepalantina e 8,8'-paepalantina dímero apresentaram atividade antimicrobiana sobre cepas bacterianas ATCC. Diferentemente dos trabalhos anteriormente citados, no presente estudo, as amostras bacterianas utilizadas foram isoladas de casos clínicos humanos e em ambiente hospitalar, onde o contato frequente com antibacterianos, a

pressão seletiva, contribui na disseminação de mecanismos de resistência entre os micro-organismos. Para estas amostras, além dos testes fenotípicos, foram realizados métodos genotípicos para caracterizar a epidemiologia molecular dos isolados bacterianos.

Não existe um consenso sobre a CMI aceitável para produtos naturais quando comparados com antibacterianos padrões (DOMINGUES *et al.*, 2015). Vários estudos consideram como forte potencial inibitório *in vitro* se as substâncias demonstram CMI de até 100 µg/mL, atividade inibitória moderada de 100-500 µg/mL, atividade fraca de 500-1000 µg/mL e inativos maiores que 1000 µg/mL (HOLETZ *et al.*, 2002; TANAKA *et al.*, 2005; AYRES *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008). Assim sendo, de acordo com este padrão estabelecido, em nosso estudo, a paepalantina apresentou forte potencial inibitório para as amostras de *E. faecium*, com CMI de 32 µg/mL, ao passo que o dímero variou com CMI entre 32 e 64 µg/mL. Entretanto, a associação de ambas as substâncias à vancomicina apresentou efeito indiferente para todas as amostras. Devienne e colaboradores (2005), através da técnica de microdiluição em caldo, avaliaram a atividade antimicrobiana da paepalantina em amostras de *Enterococcus faecalis* ATCC 10541 e observaram CMI de 15,6 µg/mL.

Nas amostras de *S. aureus*, a paepalantina e o dímero apresentaram forte potencial inibitório, com CMI de 16 µg/mL e 8 µg/mL, respectivamente. Devienne e colaboradores (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana da paepalantina em amostras de *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 e observaram CMI de 15,6 µg/mL e 3,9 µg/mL, respectivamente. Diferente do presente trabalho, esse estudo avaliou apenas amostras-padrão. Quando a paepalantina foi associada com a oxacilina foi observado efeito sinérgico em duas das cinco amostras analisadas. Por sua vez, a associação entre dímero e oxacilina apresentou efeito sinérgico em todas as cinco amostras. Estes resultados são promissores, visto que uma das poucas alternativas terapêuticas para MRSA é a vancomicina. Contudo, cepas de *S. aureus* com sensibilidade intermediária à vancomicina (VISA) e resistentes à vancomicina (VRSA) já foram reportadas em vários países e no Brasil, e tem sido motivo de grande preocupação no controle da resistência bacteriana (GARDETE, TOMASZ, 2014; ROSSI *et al.*, 2014).

Damasceno (2016) avaliou a associação da paepalantina com amoxicilina e metronidazol frente a *H. pylori* ATCC 43504. Tal associação resultou no implemento de atividade anti-*H. pylori* com ocorrência de sinergismo. Um quarto de CMI (32

µg/mL) de paepalantina em associação com amoxicilina resultou no aumento de eficácia do antibacteriano com a redução da CMI da amoxicilina de 0,25 µg/mL para 0,031 µg/mL. Os resultados da associação de paepalantina com metronidazol mostraram CMI de 16 µg/mL, caracterizando sinergismo importante visto que a cepa de *H. pylori* utilizada neste estudo é resistente ao metronidazol.

A paepalantina e o dímero frente às bactérias Gram-negativas analisadas apresentaram CMI superiores a 256 µg/mL em todos os casos, demonstrando fraca atividade. Além disso, quando analisadas as associações entre paepalantina/meropenem e dímero/meropenem os resultados foram indiferentes em todas as amostras, com ICIF > 0,5. Ensaios biológicos *in vitro* realizados por Vilegas *et al.* (1990), determinaram em 250 µg/mL a CMI da paepalantina para a *E. coli*, também demonstrando baixa atividade nessa espécie.

Deve ser destacado que estudos analisando a atividade antimicrobiana da paepalantina são muito escassos e em relação ao dímero, mesmo após vasta pesquisa em sites de busca de artigos científicos, não encontramos estudos que tivessem analisado sua atividade em bactérias hospitalares. Por exemplo, uma pesquisa no *Pubmed* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Paepalantine+dimer](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Paepalantine+dimer), em 09/11/2016) com os termos *Paepalantine + dimer* apresentou apenas quatro artigos, todos do mesmo grupo de pesquisa do Brasil. Evidentemente, que isso pode, em parte, ser explicado pela ausência de *P. bromelioides* em outros locais, o que torna essa pesquisa ainda mais relevante do ponto de vista do ineditismo.

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia (MACIEL *et al.*, 2002). Os estudos *in vitro* de estrutura e atividade realizados com cumarinas sugerem que a presença de atividade antimicrobiana esteja diretamente relacionada com a lipofilicidade e a estrutura planar da molécula (KAYSER; KOLODZIEJ, 1999), sendo, provavelmente, este caráter lipofílico e a estrutura planar da molécula o responsável pela fácil difusão passiva e interações com a membrana celular bacteriana (RAUCKMAN, 1989). Combinações de características estruturais planares, lipofilicidade e hidroxilas nas posições 9 e 10 formando um sistema catecol, podem refletir nas propriedades potencialmente antimicrobianas da paepalantina (VILEGAS *et al.*, 1990; DEVIENNE *et al.*, 2002). Outro possível mecanismo de ação da paepalantina baseia-se nos antibacterianos aminocumarínicos (novobiocina, coumermicin A1 e clorobiocina),

que interagem com a subunidade B da DNA girase bacteriana, inativando a atividade da enzima adenosina trifosfatase (ATPase) (LAURIN *et al.*, 1999).

A isocumarina paepalantina está incluída no grupo de metabólitos secundários denominados compostos fenólicos. Vários pesquisadores investigam o potencial de compostos fenólicos e outras substâncias como antimicrobianos e/ou moduladores da resistência em bactérias MDR. SILVA (2015) avaliou o potencial modulador e efeito sinérgico de flavonoides, taninos e ácido fenólicos com os antimicrobianos norfloxanina (NOR), tetraciclina e eritromicina em *S. aureus*. Os compostos testados não apresentaram atividade antimicrobiana na concentração de até 128 µg/mL. No teste de associação com os antimicrobianos, os flavonoides aglicona reduziram a CMI da NOR em até dezesseis vezes (128 para 8 µg/mL). Os flavonoides C-glicosilados, miricetrin e quercetrin, reduziram a CMI da NOR em até quatro vezes (128 para 32 µg/mL). Além disso, o galotanino (ácido tânico – AT) reduziu em 32 vezes a CMI da NOR (128 para 4 µg/mL), apresentando efeito sinérgico quando aplicado em combinação com esse fármaco (ICIF = 0,15). Com os resultados obtidos, a autora demonstrou que alguns compostos fenólicos, possuem um potencial de aplicação como adjuvante de antibióticos, particularmente quando em uso combinado com norfloxacin.

SARAIVA (2012) determinou a atividade antibacteriana de extratos e frações das plantas *Eleutherine plicata* (marupazinho), *Geissospermum vellosii* (pau-pereira) e *Portulaca pilosa* (amor-crescido) frente a isolados de MRSA e de *P. aeruginosa* multirresistentes, provenientes infecções humanas, assim como a interação destes produtos vegetais com fármacos antimicrobianos de uso clínico. Os extratos obtidos de *E. plicata* e *G. vellosii* apresentaram CMI de 125 µg/mL frente a amostras de MRSA, enquanto que o obtido de *P. pilosa* apresentou CMI de 250 µg/mL em amostras de *P. aeruginosa* multirresistentes. Esse estudo testou 120 combinações entre os extratos das plantas e os diferentes antimicrobianos. Em relação às amostras de MRSA houve sinergismo com os fármacos ciprofloxacina, clindamicina e vancomicina, tanto com os derivados de *E. plicata* como os de *G. vellosii*. Os produtos de *P. pilosa* potencializaram a ação dos fármacos aztreonam, cefepime e piperacilina+tazobactam frente aos isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes.

Os ecossistemas marinhos também constituem uma promissora fonte de produtos naturais para a bioprospecção de novas substâncias com ação frente a bactérias. Prompanya *et al.* (2014), isolaram novos derivados de isocumarinas e

terpenóides na associação entre fungos e espongiários. Neste estudo, todos os compostos foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e também cepas multirresistentes. Nenhum composto demonstrou atividade antimicrobiana relevante, apresentando CMI > 256 µg/mL. Ensaio com o meroterpeno chevalone E, quando testada frente a amostras de MRSA, apresentou CMI > 1024 µg/mL. Entretanto, quando associado ao antibacteriano oxacilina, apresentou efeito sinérgico, com IFIC 0,188. Assim, os autores concluíram que o sinergismo da chevalone E com o antibacteriano oxacilina frente a amostras MRSA, pode ser considerado relevante para a investigação de antimicrobianos em produtos naturais marinhos (PROMPANYA *et al.*, 2014).

Devida a obtenção de resultados promissores da atividade da paepalantina/dímero frente a *S. aureus*, foram realizadas análises por microscopia eletrônica de varredura nessas amostras. Os resultados mostraram que não houve alteração nas células expostas a diferentes concentrações de paepalantina/dímero quando comparadas a um controle crescido no meio sem as substâncias. A morfologia bacteriana não foi alterada, conservando a forma esférica, arranjadas em cachos, com dimensões em torno de 0,5 a 1,0 µm. Estudos realizados por DAMASCENO (2016) com microscopia eletrônica de varredura, detectou alterações ultraestruturais consideráveis em *Helicobacter pylori* expostas a CMI e sub-CMI de paepalantina. O autor observou importantes alterações morfológicas na forma e superfície da bactéria comparada ao controle. Para as bactérias cultivadas na CMI de paepalantina, observou perda da forma espiralada para formas cocoides e a ocorrência de extravasamento de conteúdo intracelular por rompimentos na membrana. As amostras cultivadas na sub-CMI apresentaram em geral tendência para forma cocóide em um dos polos e formas alongadas características e perda de capacidade de divisão celular. Alterações na superfície de *H. pylori* também são observadas na sub-CMI de paepalantina com a formação de protuberâncias na membrana, relatadas na literatura como “blebs”.

A citotoxicidade significa causar efeito tóxico a nível celular, podendo ser por morte celular, alterações na permeabilidade da membrana ou inibição enzimática (VIANA *et al.*, 2011). A paepalantina isolada de *Paepalanthus vellozoides*, mostrou forte atividade mutagênica e citotóxica no teste de Ames em culturas de células de ovário de hamster Chinês (CHO) (VARANDA *et al.*, 1997). Tavares *et al.* (1999) avaliou o possível efeito clastogênico deste composto em linfócitos de sangue

periférico humano e células de medula óssea em ratos Wistar; os autores concluíram que a paepalantina nas concentrações de 6.25, 12.5 and 25 mg/kg não tinha um efeito clastogênico, mas era significativamente citotóxica nos sistemas de células de mamífero *in vitro* e *in vivo* testados neste estudo. Devienne *et al.* (2002) em estudos relacionando estrutura e atividade de algumas isocumarinas naturais e semi-sintéticas, estruturalmente semelhantes à paepalantina, mostrou que alterações na estrutura química alteram a atividade citotóxica em células McCoy.

Como citados anteriormente, diversos estudos vem sendo realizados no sentido de descrever substâncias que tenham atividade ou que possam atuar de modo sinérgico com antibacterianos já utilizados na rotina médica. Pesquisas desse tipo são relevantes, uma vez que propiciam uma perspectiva de desenvolvimento de um produto biotecnológico, disponibilizando novas terapias com a associação de fármacos e produtos naturais, visto que o Brasil é detentor de uma rica biodiversidade. Esse nosso estudo visou contribuir para este fim, analisando a atividade de substâncias naturais frente a bactérias hospitalares multirresistentes.

## 7 CONCLUSÕES

- Frente às amostras de *E. faecium*, a paepalantina e o dímero isoladamente apresentaram boa atividade, entretanto, o efeito da associação com vancomicina não foi relevante;
- Nas amostras de *S. aureus*, o dímero isoladamente demonstrou melhor atividade antibacteriana do que a paepalantina. A associação do dímero com a oxacilina levou a uma redução na CMI de até 256 vezes desse fármaco, indicando ser essa substância a mais efetiva para uso em combinação, sendo mais promissora na bioprospecção de novas substâncias com atividade frente, sobretudo, aos MRSA.
- Foi demonstrado que nas espécies de bactérias Gram-negativas analisadas (*K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) a paepalantina e o dímero isoladamente possuem fraca atividade. Além disso, quando associadas ao meropenem não apresentaram qualquer sinergismo;
- As análises por microscopia eletrônica de varredura nas amostras de *S. aureus* demonstraram que a paepalantina e o dímero não atuam alterando a estrutura externa desse micro-organismo nas condições utilizadas neste estudo.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, J. G. et al. Naphthopyranones from rhizomes of *Paepalanthus diffissus*. *Avances en Quimica*, v. 8, n. 3, p. 131–138, 2013.
- AMARAL, F. P. DO et al. HPLC-ESIMSn Profiling, isolation, structural elucidation, and evaluation of the antioxidant potential of phenolics from *Paepalanthus geniculatus*. *Journal of Natural Products*, 2012.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.
- AMORIM, M. R. DE et al. HPLC-DAD based method for the quantification of flavonoids in the hydroethanolic extract of *Tonina fluviatilis* Aubl. (*Eriocaulaceae*) and their radical scavenging activity. v. 38, n. 5, p. 622–630, 2014.
- ANVISA. 2012. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 20, de 05 de maio de 2012. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. *Diário Oficial da União* de 09 de maio de 2012, (seção 1): 39-40.
- ANVISA. 2013. Instrução Normativa nº 1, de 14 de janeiro de 2013. Altera a Instrução Normativa nº 07 de 16 de dezembro de 2011 que dispõe sobre o cronograma e procedimentos para credenciamento de farmácias e drogarias privadas referentes à escrituração dos medicamentos e substâncias contendo antimicrobianos no Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC). *Diário Oficial da União* de 16 de janeiro de 2013, (seção 1): 27.
- ANVISA. Nota Técnica Nº 01/2013. Câmara Técnica De Resistência Microbiana Em Serviços De Saúde, p. 1–22, 2013.
- ANVISA. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM: Resistência Microbiana em IPCSL relacionada a CVC. n. 2013, p. 1–45, 2014.
- ANVISA. Orientações gerais para a implantação da sub-rede analítica de resistência microbiana em serviços de saúde. Brasília, 31 de dezembro de 2015. n. 2014, 2015.
- ANVISA. Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Boletim Rede RM. Brasil, 10 jul. 2009. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede\\_rm/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/index.htm) - Acessado em 18 de outubro de 2016
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature reviews. Microbiology*, v. 10, n. 4, p. 266–78, 2012.
- ARNOLD, R. S. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Southern Medical Journal*, v. 104, n. 1, p. 40–45, jan. 2011.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, dez. 2015.

- AYRES, M. C. C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, n. 1, p. 90–97, 2008.
- BACCHI, R. R. et al. The most common bacteria that cause hospital infections today. As principais bactérias causadoras de infecção hospitalar na atualidade. n. 1, p. 226–230, 2014.
- BASAK, S.; SINGH, P.; RAJURKAR, M. Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. *Journal of Pathogens*, v. 2016, p. 1–5, 2016.
- BATABYAL, B.; KUNDU, G. K. R.; BISWAS, S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Brief Review. *International Research Journal of Biological Science*, v. 1, n. 7, p. 65–71, 2012.
- BATISTA, L. M. et al. Gastric Antiulcer Activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 27, n. 3, p. 328–332, 2004.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 9, n. 2, p. 148–165, 1996.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. December, p. 42–51, 2014.
- BOECKEL, T. P. V. et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 14, n. 8, p. 742–750, 2014.
- BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin.Infect.Dis.*, v. 43 Suppl 2, n. 1537-6591 (Electronic), p. S49–S56, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Leis, etc. Portaria 2.616 de 12 de maio de 1998. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção pelos hospitais do País de programas de controle de infecção hospitalar. *Diário Oficial da União*. Brasília, 13 maio de 1998. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616\\_12\\_05\\_1998.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html)> Acesso em 16 de outubro de 2016.
- BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*, v. 65, p. 455–478, 2011.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for beta-lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

CAG, Y. et al. Resistance mechanisms. *Annals of Translational Medicine*, v. 4, n. 17, p. 326–326, 2016.

CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: Is it time to divorce. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 4, p. 731–742, 2013.

CAVALCANTE, F.S.; SCHUENCK, R.P.; FERREIRA, D.C.; DA COSTAS, C.R.; NOUÉR, S.A.; DOS SANTOS, K.R.N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: spread of specific lineages among patients in different wards at a Brazilian teaching hospital. *J. Hosp. Infect.*, v. 86, p. 151-154, 2014.

CLSI. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial. 25ª ed, 2015.

CLSI, Norma M07-A10: Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma aprovada, 10ª ed, 2015.

COELHO, R. G. et al. A new cytotoxic naphthopyrone dimer from *Paepalanthus bromelioides*. *Fitoterapia*, v. 71, n. 5, p. 497–500, 2000.

COELHO, R. G. et al. Phytochemical study and antiulcerogenic activity of *Syngonanthus bisulcatus* (*Eriocaulaceae*). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 3, p. 413–417, 2006.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas pra o futuro - região Sul. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Brasília 2011.

COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. *Eriocaulaceae* na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. *Megadiversidade - Cadeia do Espinhaço: avaliação do conhecimento científico e prioridades de conservação*, v. 4, n. 1-2, p. 91–99, dez. 2008.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, v. 12, n. 4, p. 564–82, 1999.

CRANK, C.; O'DRISCOLL, T. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance*, p. 217, jul. 2015.

CUPANE, L. et al. Patients with Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* infections run an increased risk of longer hospitalisation. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, v. 3, n. 1, p. 48–55, 2012.

DAMASCENO, J. P. L. et al. Preformulation study and influence of DMSO and propylene glycol on the antioxidant action of isocoumarin paepalantine isolated from *Paepalanthus bromelioides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, n. 4, p. 395–400, 2015.

DAMASCENO, J. P. L. Estudo de Solubilidade e das Atividades Antioxidante e Anti-*Helicobacter pylori* da Isocumarina paepalantina obtida de *Paepalanthus latipes* Silv. Dissertação de Mestrado. UFES, 2016.

DAVID, M. Z.; DAUM, R. S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, n. 3, p. 616–687, 2010.

DEAK, D. et al. Progress in the Fight Against Multidrug-Resistant Bacteria? A Review of U.S. Food and Drug Administration–Approved Antibiotics, 2010–2015. *Annals of Internal Medicine*, p. 2010–2015, 2016.

DEVIENNE, K. F. Avaliação da atividade biológica in vitro de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides*. 126f. Dissertação Mestrado em Biotecnologia – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Araraquara: 2000.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, n. 2, p. 166–168, 2002.

DEVIENNE, K. F. et al. In vitro cytotoxicity of some natural and semi-synthetic isocoumarins from *Paepalanthus bromelioides*. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, v. 57, n. 1-2, p. 85–88, 2002.

DEVIENNE, K. F. et al. Structure-antimicrobial activity of some natural isocoumarins and their analogues. *Phytomedicine*, v. 12, n. 5, p. 378–381, 2005.

DI STASI, L. C. et al. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides*, in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Planta Medica*, v. 70, n. 4, p. 315–320, 2004.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*, v. 5, n. 12, p. 939–951, 2007.

DOMINGUES, K. et al. Avaliação de extratos de quebra-pedra (*Phyllanthus* sp) frente à patógenos causadores de infecções no trato urinário. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.17, n.3, p.427-435, 2015.

DZOTAM, J. K.; TOUANI, F. K.; KUETE, V. Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafaffa* Lam., *Moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 16, n. 1, p. 9, 2016.

FEDORENKO, V. et al. Antibacterial discovery and development: from gene to Product and Back. *BioMed Research International*, v. 2015, 2015.

FERNANDES, M. R. et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. *Eurosurveillance*, v. 21, n. 17, p. 1–6, 2016.

FONSECA, E. L. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of carO alleles expression and bla<sub>OXA-23</sub> gene. *BMC microbiology*, v. 13, n. 1, p. 245, 2013.

- FONSECA, E. L. et al. Full characterization of the integrative and conjugative element carrying the metallo-beta-lactamase bla<sub>SPM-1</sub> and bicyclomycin bcr1 resistance genes found in the pandemic *Pseudomonas aeruginosa* clone SP/ST277. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 9, p. 2547–2550, 2015.
- FRIEDEN, T. Antibiotic resistance threats. Center for Disease Control and Prevention, CDC - 2013.
- FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, n. 4, p. 627–641, 2008.
- FURTADO, G. H. et al. Clinical culture surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in a teaching hospital in Sao Paulo, Brazil: a 7-year study. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 27, n. May, p. 1270–1273, 2006.
- GACCHE, R. N.; JADHAV, S. G. Antioxidant activities and cytotoxicity of selected coumarin derivatives: preliminary results of a structure-activity relationship study using computational tools. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, v. 4, n. 3, p. 165–169, 2012.
- GARCIA, L. M. et al. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogarresistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 3, n. 2, p. 45–49, 2013.
- GARCÍA-ARGÁEZ, A. N. et al. Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. *Planta Medica*, v. 66, n. 3, p. 279–281, 2000.
- GARDETE, S.; TOMASZ, A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n. 7, p. 2836–40, 2014.
- GISKE, C. G. et al. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 3, p. 813–821, 2008.
- GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, n. S5, p. S350–S359, 2008.
- GREMA, H. A. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A Review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, v. 3, n. 2, p. 79–98, ago. 2015.
- GUPTA, N. et al. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: Epidemiology and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, v. 53, n. 1, p. 60–67, 2011.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.
- HELGELAND, L. The Action of Vitamin K and Coumarin Anticoagulants. *Biochemical Education*, v. 8, n. 3, p. 66-69, 1980.

- HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): An emerging cause of multidrug-resistant infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, n. 6, p. 1119–1125, 2010.
- HOGBERG, L. D.; HEDDINI, A.; CARS, O. The global need for effective antibiotics: Challenges and recent advances. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 31, n. 11, p. 509–515, 2010.
- HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.
- HONG, D. J. et al. Epidemiology and characteristics of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Chemotherapy*, v. 47, n. 2, p. 81–97, 2015.
- JESUS, M. B. DE et al. Review - Understanding  $\beta$ -lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Resistance - An Open Challenge*, 2015.
- JIMENEZ-ARELLANES, A. et al. Activity against Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican Plants Used to Treat Respiratory Diseases. *Phytother. Res. PHYTOTHERAPY RESEARCH* *Phytother. Res*, v. 17, n. 17, p. 903–908, 2003.
- JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. *The Journal of infectious diseases*, v. 186, n. 6, p. 859–864, 2002.
- KANG, C. I.; SONG, J. H. Antimicrobial resistance in Asia: Current epidemiology and clinical implications. *Infection and Chemotherapy*, v. 45, n. 1, p. 22–31, 2013.
- KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H. Antibacterial activity of simple coumarins: Structural requirements for biological activity. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, v. 54, n. 3-4, p. 169–174, 1999.
- KIM, U. J. et al. Update on the epidemiology, treatment, and outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections. *Chonnam Med J*, v. 50, n. 2, p. 37, 2014.
- KITAGAWA, R. R. et al. A new cytotoxic naphthoquinone from *Paepalanthus latipes*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, v. 52, n. 12, p. 1487–8, 2004.
- KITAGAWA, R. R. et al. Evaluation of mutagenicity and metabolism-mediated cytotoxicity of the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin from *Paepalanthus latipes*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 25, n. 1, p. 16–21, 2015.
- KLENKAR, J.; MOLNAR, M. Natural and synthetic coumarins as potential anticancer agents. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 7, n. 7, p. 1223–1238, 2015.
- KÖCK, R. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, v. 15, n. 41, p. 19688, 2010.

- KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews. Microbiology*, v. 8, n. 6, p. 423–35, 2010.
- LAKSHMI, G. J. Mechanism of Resistance, Phenotyping and Genotyping of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 4, n. 3, p. 810–818, 2015.
- LAURIN, P. et al. Synthesis and in vitro evaluation of novel highly potent coumarin inhibitors of gyrase B. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 9, n. 14, p. 2079–2084, 1999.
- LECLERCQ R, et al. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.1989.
- LEE, G. C.; BURGESS, D. S. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 11, n. 1, p. 32, 2012.
- LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 12, n. 5, p. 371–87, 2013.
- LIAKOPOULOS, A. et al. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC infectious diseases*, v. 13, n. 1, p. 505, 2013.
- LIMA, R. A. et al. Microbiological evaluation of isolated compounds from the bark of *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek (*Celastraceae*). *REGET/UFMS*, p. 592–603, 2016.
- LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 4, p. 582–610, 2009.
- LIU, Y. Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2015.
- MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quimica Nova*, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.
- MACK, D. et al. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 387, n. 2, p. 399–408, 2007.
- MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
- MARGARET, M. et al. GERÊNCIA DE PROJETOS E PESQUISAS O herbário da UFMG - *Eriocaulaceae* nos parques estaduais Sempre-vivas brasileiras: coleções - tipos - A importância dos naturalistas para a biodiversidade. *MG.BIOTA* - v. 4, n.6 – Fevereiro / Março - 2012.

MELO, J. G. DE; AMORIM, E. L. C. DE; ALBUQUERQUE, U. P. DE. Native medicinal plants commercialized in Brazil - Priorities for conservation. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 156, n. 1-4, p. 567–580, 2008.

MENDES, R. E.; DESHPANDE, L. M.; JONES, R. N. Linezolid update: Stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. Elsevier Ltd. v. 17. 2014

MENEGUETI, Mayra Gonçalves et al . Avaliação dos programas de controle de infecção hospitalar em serviços de saúde. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, Ribeirão Preto , v. 23, n. 1, p. 98-105, Feb. 2015

MESAROS, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, n. 6, p. 560–578, 2007.

MIRHOSEINI, Seyed Hamed et al. Hospital air: A potential route for transmission of infections caused by beta-lactam-resistant bacteria. *American Journal of Infection Control* , Volume 44 , Issue 8 , 898 - 904

MIYASAKI Y, et. al. Isolation and characterisation of antimicrobial compounds in plant extracts against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 2013; 8(4): e61594.

MOREIRA, R. R. D. et al. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (*Eriocaulaceae*) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, n. 1, p. 11–19, 2002.

MOREIRA, R. R. D. et al. *Paepalanthus* spp: Antimycobacterial activity of extracts, methoxylated flavonoids and naphthopyranone fractions. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 23, n. 2, p. 268–272, 2013.

MURRAY, PATRICK R.; ROSENTHAL, KEN S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. 7.<sup>a</sup> ed. Elsevier, 2014.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 247–256, 2000.

NATHWANI, D. Health economic issues in the treatment of drug-resistant serious Gram-positive infections. *Journal of Infection*, v. 59, n. SUPPL. 1, p. S40–S50, 2009.

NEMEC, A. et al. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. *Journal of Medical Microbiology*, v. 53, n. 12, p. 1233–1240, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. *The Practice of Medicinal Chemistry: Fourth Edition*, p. 101–139, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 3, p. 311–335, mar. 2012.



- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, n. 3, p. 629-661, Mar. 2016.
- NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 10, p. 1791–1798, out. 2011.
- NORDMANN, P. et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 5, p. 432–438, 2012.
- NTOKOU, E. et al. Intensive care unit dissemination of multiple clones of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, n. 8, p. 1819–1823, 2012.
- O'DRISCOLL, C. et al. First outbreak of linezolid-resistant vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an Irish hospital, February to September 2014. *Journal of Hospital Infection*, v. 91, n. 4, p. 367–370, 2015.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 52, n. June, p. 1, 2003.
- OLIVEIRA, C. F. et al. Prevalence of the TEM, SHV and CTX-M families of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp at the University Hospital of Santa Maria, State of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 42, n. 5, p. 556–560, 2009.
- OLIVEIRA, D. V.; VAN DER SAND, S. T. Phenotypic tests for the detection of beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* isolated from different environments. *Current Microbiology*, 2016.
- OMS/WHO - World Health Organization, 2010. Medicines: rational use of medicines Fact sheet N°338, May 2010.
- OMS/WHO – World Health Organization, 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO Library Cataloguing – in -Publication Data
- PANÁČEK, A.; Smékalová, M.; Večeřová, R.; Bogdanová, K.; Röderová, M.; Kolář, M.; Kilianová, M.; Hradilová, Š.; Froning, J.P.; Havrdová, M.; et al. Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant enterobacteriaceae (Supplementary material). *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2016, 142, 392–399.
- PATERSON, D. L. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin.Infect.Dis.*, v. 43 Suppl 2, n. 1537-6591 (Electronic), p. S43–S48, 2006.
- PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016.
- PCAST. Report To the President on combating antibiotic resistance. n. September, p. 1–78, 2014.

- PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Annual Review of Biochemistry, v. 84, p. 577–601, 2015.
- PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clinical Microbiology Reviews, v. 21, n. 3, p. 538–582, 2008.
- PEREZ, F. et al. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 51, n. 10, p. 3471–3484, 2007.
- PILLAI, S.K., MOELLERING, R.C. and ELIOPOULOS, G.M. Antimicrobial combinations. In LORIAN, V. Antibiotics in Laboratory Medicine, 5th ed. (2005). pp. 365–440. Philadelphia, PA 19106, USA: Lippincott, Williams & Wilkins.
- PINHO, L. DE et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. Ciência Rural, v. 42, n. 2, p. 326–331, 2012.
- PROMPANYA, C. et al. New isocoumarin derivatives and meroterpenoids from the marine sponge-associated fungus *Aspergillus similanensis* sp. Nov. KUFA 0013. Marine Drugs, v. 12, n. 10, p. 5160–5173, 2014.
- QUEIROZ, G. M. et al. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. Revista Brasileira de Clínica Médica, v. 10, n. 2, p. 132–138, 2012.
- RAUCKMAN, B.S.; TIDWELL, M.Y.; JOHNSON, J.V.; ROTH, B. 2,4-Diamino-5-benzyl- pyrimidines and analogues as antibacterial agents. 10. 2,4-Diamino-5-(6-quinolyl-methyl)- and -[(tetrahydro-6-quinolyl)methyl]pyrimidine derivatives. Further specificity studies. Journal of Medicinal Chemistry, v. 32, p. 1927-1935, 1989.
- RIBEIRO, C. V. C.; KAPLAN, M. A. C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em angiospermae. Química Nova, v. 25, n. 4, p. 533–538, jul. 2002.
- RICE, L. B. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin.Infect.Dis., v. 43 Suppl 2, n. 1537-6591 (Electronic), p. S100–S105, 2006.
- ROGERS, K. L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections. Infectious Disease Clinics of North America, v. 23, n. 1, p. 73–98, 2009.
- ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. Clinical Infectious Diseases, v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.
- ROSSI, F. et al. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. N.Engl.J.Med, v. 370, n. 1533-4406 (Electronic), p. 1524–1531, 2014.
- ROUT, S. P. et al. Plants in traditional medicinal system-future source of new drugs. J Pharm Pharm Sci, v. 1, n. 1, p. 1–23, 2009.
- SARAIVA, R.M.C. Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente á bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas. 94f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2012.
- SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 103, n. 3, p. 277–281, 2008.

- SHOKOOHIZADEH, L. et al. High frequency distribution of heterogeneous vancomycin resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) in Iranian hospitals. *Diagnostic Pathology*, v. 8, n. 1, p. 163, 2013.
- SHON, A. S.; BAJWA, R. P. S.; RUSSO, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence*, v. 4, n. 2, p. 107–118, fev. 2013.
- SILVA, M. A. et al. High-performance liquid chromatographic quantification of flavonoids in *Eriocaulaceae* species and their antimicrobial activity. *Molecules*, v. 14, n. 11, p. 4644–4654, 2009.
- SILVA, R. M. ; TRAEBERT, J.; GALATO, D. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: a review of epidemiological and clinical aspects. *Expert opinion on biological therapy*, v. 12, n. 6, p. 663–71, 2012.
- SILVA, HELENA TAINA DINIZ. Potencial de compostos fenólicos como antimicrobianos e/ou moduladores da resistência em *Staphylococcus aureus*. 72f. Dissertação de Mestrado - João Pessoa, 2015.
- SUJATHA, S.; PRAHARAJ, I. Glycopeptide resistance in gram-positive Cocci: A review. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2012, 2012.
- TADA, T. et al. IMP-51, a novel IMP-type metallo-beta-lactamase with increased doripenem and meropenem hydrolyzing activities, in a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. v. 59, n. 11, p. 7090–7093, 2015.
- TAMMA, P. D.; COSGROVE, S. E.; MARAGAKIS, L. L. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 25, n. 3, p. 450–470, 2012.
- TANAKA, J. C. A. et al. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (*Tiliaceae*). *Quimica Nova*, v. 28, n. 5, p. 834–837, 2005.
- TANEJA, N.; KAUR, H. Insights into newer antimicrobial agents against Gram-negative bacteria. *Microbiology insights*, v. 9, p. 9–19, 2016.
- TANWAR, J. et al. Multidrug resistance: An emerging crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2014, 2014.
- TAVARES, D.C., Varanda, E.A., Andrade, F.D., Vilegas, W., Takahashi, C.S. Evaluation of the genotoxic potential of the isocoumarin paepalantine in *in vivo* and *in vitro* mammalian systems. *Journal of Ethnopharmacology* 68, 115–120, 1999.
- TAWEECHASUPAPONG, S. et al. Antibiofilm activity and post antifungal effect of lemongrass oil on clinical *Candida dubliniensis* isolate. *South African Journal of Botany*, v. 78, p. 37–43, 2012.
- TIJET, N. et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) producing *Enterobacteriaceae* in Ontario, Canada, 2008-2011. *PLoS ONE*, v. 9, n. 12, p. 2008–2011, 2014.
- TRAUGOTT, K. A. et al. Monotherapy or combination therapy? The *Pseudomonas aeruginosa* conundrum. *Pharmacotherapy*, v. 31, n. 6, p. 598–608, 2011.

- TSENG, I. L. et al. Emergence of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* and Spread of KPC-2 and KPC-17 in Taiwan: A nationwide study from 2011 to 2013. *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, p. 1–11, 2015.
- TUMBARELLO, M. et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 7, p. 2133–2143, 2014.
- VALLE, D. L. et al. Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary hospital in the Philippines. *Tropical Medicine and Health*, v. 44, n. 1, p. 1, 2016.
- VARANDA, E.A.; Raddi, M.S.G.; Dias, F.L.; Araujo, M.C.P.; Gibran, S.C.A.; Takahashi, C.S.; Vilegas, W. Mutagenic and Cytotoxic Activity of an Isocoumarin (Paepalantine) Isolated From *Paepalanthus vellozioides*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, v.17, p.85–95, 1997.
- VARANDA, E. A.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; FURUYA, E. M.; VILEGAS, W. Mutagenicity of paepalantine dimer and glycoside derivatives from *Paepalanthus bromelioides*. *Toxicology in Vitro*, v. 18, n. 1, p. 109–114. 2004.
- VARANDA, E. A. et al. Mutagenic and cytotoxic effect of planifolin: A naphthopyranone dimer isolated from *Paepalanthus planifolius*. *Toxicology in Vitro*, v. 20, n. 5, p. 664–668, 2006.
- VIANA, A. R. ; Monteiro, F. L. ; Isaia, H. A. ; Stefanon, E. ; Garcia, L.F.M ; Sagrillo, M.R. . Avaliação da atividade antiproliferativa e citotóxica do extrato aquoso de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. *Revista Contexto & Saúde* , v. 10, p. 747-752, 2011.
- VILEGAS, W. et al. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. *Phytochemistry*, v. 29, n. 7, p. 2299–2301, jan. 1990.
- VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, v. 4, n. 4, p. 481–489, 2002.
- WANNMACHER, L. Uso Racional de anti-inflamatórios. *Uso racional de medicamentos: temas selecionados*, p. 41–50, 2012.
- WENDLANDT, S.; SCHWARZ, S.; SILLEY, P. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a food-borne pathogen? *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 4, n. 1, p. 117–139, 2013.
- WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; et al. Koneman, *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas colorido*. 6ª ed. São Paulo: Guanabara-Koogan, 2008.
- ZANUTTO, F. V. et al. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in methanol extracts of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog by HPLC-ESI-IT-MSn and their mutagenic activity. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 18, n. 1, p. 244–262, 2012.
- ZHAO, S.-Y. et al. An investigation of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a comprehensive hospital of East China. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, v. 14, n. 1, p. 7, 2015.

ZOWAWI, H. M. et al. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Scientific Reports, v. 5, p. 15082, 2015.