



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

MARIANA ARAUJO DE OLIVEIRA

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE CORDIAQUINONAS OBTIDAS DE *Cordia polycephala***

PARNAÍBA – PI  
Junho, 2019

MARIANA ARAUJO DE OLIVEIRA

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE CORDIAQUINONAS OBTIDAS DE *Cordia polycephala***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Novas Tecnologias e Metodologias de Diagnóstico e Tratamento

Orientadora: Dra. Ana Jérsia Araújo

PARNAÍBA – PI  
Junho, 2019

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

O482p Oliveira, Mariana Araujo de.  
Potencial antibacteriano de cordiaquinonas obtidas de *Cordia polycephala* [recurso eletrônico] / Mariana Araujo de Oliveira. – 2019.  
1 Arquivo em PDF

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2019.  
Orientação: Prof. Dra. Ana Jérsia Araújo.

1. Plantas medicinais. 2. Produtos de plantas medicinais. Naftoquinonas.  
3. Antimicrobiano. 4. Antibiofilme I. Título.

CDD: 615.321

MARIANA ARAUJO DE OLIVEIRA

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE CORDIAQUINONAS OBTIDAS DE *Cordia polycephala***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Aprovada em 25/06/2019

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr Jefferson Soares de Oliveira

Universidade Federal do Piauí

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Leiz Maria Costa Veras

Universidade Federal do Piauí

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ana Jérsia Araújo

Universidade Federal do Piauí

(Orientadora)

PARNAÍBA – PI  
Junho, 2019

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por manter a minha cabeça acima d'água e me permitir chegar até aqui.

À minha orientadora, Profa. Dr<sup>a</sup>. **Ana Jérsia Araújo**, por todo o apoio e paciência, e pelos preciosos ensinamentos ao longo desse trabalho.

À Profa. Dr<sup>a</sup>. **Otília Deusdênia Loiola Pessoa**, do departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, por ceder as substâncias utilizadas neste trabalho.

À Profa. Dr<sup>a</sup>. **Maria José dos Santos Soares**, do Laboratório de doenças infecciosas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, pelas estirpes cedidas na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **José Roberto de Sousa de Almeida Leite**, pelos equipamentos, insumos e reagentes fornecidos para este trabalho.

Ao Prof. Dr. **José Delano Barreto Marinho Filho**, por todas as sugestões e conselhos ao longo deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> **Alyne Rodrigues de Araújo Nobre**, por toda a ajuda nas etapas experimentais deste trabalho.

Aos demais integrantes do Biotec e LCCDelta que me ajudaram diretamente (**Ayslan Batista Barros, Gisele Santos de Araújo, Raí Emanuel da Silva, Layla Martins de Castro Rocha, Taiane Maria de Oliveira e Nathalia Thamires Duarte Sousa do Rêgo**) e indiretamente na realização deste trabalho.

Aos meus pais **Maria José Araújo do Monte e Antônio Joaquim Filho**, pelo apoio incondicional, emocional e financeiro. Aos meus irmãos **Míriam Araújo de Oliveira, Aarão Araújo de Oliveira e André Araújo de Oliveira**, à minha cunhada **Sammya Vanessa Vieira Chaves de Oliveira**, aos meus tios **José Milton Araújo do monte e Karene Martins Pereira do Monte**, e demais familiares que me ajudaram e torceram por mim.

Aos meus amigos que fiz em Parnaíba ao longo da graduação e mestrado, em especial **Ana Patrícia de Oliveira, Simone de Araújo Lima, Renata Mariana de Paiva Priester, Bruna da Silva Souza, Maria Eletícia de Sousa, Cleison Bruno Machado Lima, Rayssa Kawasaki Braga Freitas, Néria Maria dos Santos**

**Vieira, Silveny Meiga Alves Vieira, Juliana Lima Queiroz, Francisco Carlos da Silva Junior, Fabio de Oliveira Silva Ribeiro e Bruno Illes**, bem como os amigos da Igreja Batista Nacional Bereana, em especial **Maria Helena Lopes da Silva, Ana Célia Lopes da Silva e Sérgio Augusto da Silva**.

Às minhas colegas de trabalho do HUCFF/UFRJ, **Cláudia Santos Penaforti Tranhaque, Renata Reis Moura Veríssimo da Costa e Regiane de Fátima Rivelli**, bem como à minha chefe **Maria Angelica Arpon Marandino Guimaraes**. Ao meu namorado **Paulo Maurício Fonseca de Carvalho**, pelo apoio, carinho e incentivo.

À banca avaliadora, Doutores **Jefferson Soares de Oliveira e Leiz Maria Costa Veras**, pela disponibilidade para avaliar este trabalho, bem como pelo tempo e atenção dedicados.

À **Universidade Federal do Piauí** e ao **Programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas**. E por fim, às agências de fomento **CAPES/CNPQ, FAPEPI, e INCT BioNat**, pelo financiamento da pesquisa.

*“E você aprende que não importa o que  
você tem na vida, mas quem você tem na  
vida”*

**William Shakespeare**

## RESUMO

As infecções bacterianas são uma das principais causas de morte no mundo especialmente em países em desenvolvimento, sendo a resistência a antibióticos e a habilidade de formar biofilmes fatores agravantes para tornar essas infecções um grave problema de saúde pública. Uma das estratégias na busca de novos agentes para combater infecções bacterianas é o uso de produtos naturais, entre eles, as diversas classes de quinonas. As cordiaquinonas são naftoquinonas obtidas de plantas do gênero *Cordia* com diversas atividades biológicas já descritas na literatura, incluindo atividades antifúngica, larvicida e citotóxica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana das cordiaquinonas B, E, L, N e O obtidas de *Cordia polycephala* contra diferentes estirpes de bactérias, incluindo estirpes resistentes à metilina. Para isso, foram determinadas as Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) seguindo as recomendações do CLSI (do inglês: *Clinical Laboratory Standard Institute* - Instituto de Padrões Clínico-Laboratoriais). Para a avaliação da inibição da formação de biofilme, concentrações de 1/2, 1/4 e 1/8 da CIM foram utilizadas, e o percentual de inibição calculado. A Microscopia de Força Atômica (MFA) foi utilizada para identificar alterações na morfologia das células bacterianas em virtude do tratamento com a cordiaquinona L. A maioria das estirpes Gram positivas testadas foram sensíveis às Cordiaquinonas B, E, L e N, sendo o menor valor de CIM observado de 7,8  $\mu\text{M}$  (2,53  $\mu\text{g/mL}$ ) da cordiaquinona L contra *Staphylococcus saprophyticus*. As cordiaquinonas B e E apresentaram o menor valor de CBM, de 62,5  $\mu\text{M}$  (20,25  $\mu\text{g/mL}$ ), contra essa mesma estirpe. As cordiaquinonas B e E também foram capazes de inibir a formação do biofilme de *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* MED 55 (espécime clínico resistente à metilina) em cerca de 90%. Dentre as alterações morfológicas avaliadas por MFA, foi observado que o tratamento com a cordiaquinona L induziu uma diminuição no tamanho das células de *S. saprophyticus*. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que as cordiaquinonas possuem um potencial antibacteriano, uma vez que podem inibir o crescimento tanto de bactérias sensíveis como resistentes à metilina, além de inibirem a formação de biofilme, um importante fator agravante de infecções bacterianas.

**Palavras-chave:** Naftoquinonas. Antimicrobiano. Antibiofilme.



## ABSTRACT

Bacterial infections are a leading cause of death, especially in developing countries, and resistance to antibiotics, plus the ability to form biofilms contribute to make those infections a major public health problem. One strategy when searching for agents to treat bacterial infections is the use of natural products, among them, the different types of quinones. Cordiaquinones are naphthoquinones obtained from plants of genus *Cordia* that have several biological activities reported in literature, such as antifungal, larvicidal and antitumor. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of cordiaquinones B, E, L, N and O against different strains of bacteria, including Methicillin resistant strains. Thus, the minimum inhibitory (MIC) and bactericidal concentration (MBC) were determined following CLSI recommendations. To evaluate if these cordiaquinones can inhibit biofilm formation 1/2, 1/4 and 1/8 of MIC was used and the percentage of inhibition was measured. Atomic force microscopy (AFM) was performed to identify alterations in bacterial cells morphology. The majority of Gram positive tested strains were susceptible to cordiaquinones B, E, L and N. The lowest MIC value was 7.8  $\mu\text{M}$  (2.53  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of Cordiaquinone L against *S. saprophyticus*. Cordiaquinones B and E showed the lowest MBC value, 62.5  $\mu\text{M}$  (20.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), against the same strain. Cordiaquinones B and E inhibit biofilm formation of *S. aureus* ATCC 29213 and *S. aureus* Med 55 (clinical specimen resistant to Methicillin) in about 90%. Among the morphological changes observed by AFM, it was observed that the treatment with cordiaquinone L reduced mean size of *S. saprophyticus* cells. The results presented in this work suggest that cordiaquinones have an antibacterial potential, since they can inhibit the growth of both sensitive and resistant to Methicillin bacteria, besides, they can inhibit biofilm formation, an important aggravating factor of bacterial infections.

**Key words:** Naphthoquinones. Antimicrobial. Antibiofilm.

## LISTA DE FIGURAS

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>Figura 1</b>  | Estrutura de uma célula bacteriana.....                                      | <b>14</b> |
| <b>Figura 2</b>  | Fatores de virulência de bactérias.....                                      | <b>15</b> |
| <b>Figura 3</b>  | Biofilme formado.....  | <b>17</b> |
| <b>Figura 4</b>  | Formação de um biofilme.....   | <b>18</b> |
| <b>Figura 5</b>  | Alvos de agentes inibidores da formação de biofilmes.....                    | <b>19</b> |
| <b>Figura 6</b>  | Histórico da aprovação de antibióticos.....                                  | <b>21</b> |
| <b>Figura 7</b>  | Mecanismos de ação dos agentes antibacterianos.....                          | <b>22</b> |
| <b>Figura 8</b>  | Mecanismos de resistência a antibacterianos.....                             | <b>24</b> |
| <b>Figura 09</b> | Fotos de <i>Cordia polycephala</i> .....                                     | <b>28</b> |
| <b>Figura 10</b> | Estrutura das cordiaquinonas relatadas na literatura.....                    | <b>31</b> |
| <b>Figura 11</b> | Cordiaquinonas B, E, L, N e O e seus componentes estruturais....             | <b>33</b> |
| <b>Figura 12</b> | Delineamento experimental.....   | <b>35</b> |
| <b>Figura 13</b> | Inibição da formação de biofilme.....  | <b>44</b> |
| <b>Figura 14</b> | Efeito da cordiaquinona L (7,8 $\mu$ M) contra <i>S. saprophyticus</i> ..... | <b>46</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                 |   |           |
|-----------------|---|-----------|
| <b>Tabela 1</b> | Estudos envolvendo cordiaquinonas descritos na literatura.....  | <b>32</b> |
| <b>Tabela 2</b> | Concentração Inibitória Mínima das cordiaquinonas B, E, L, N e O em diversas estirpes bacterianas.....                    | <b>41</b> |
| <b>Tabela 3</b> | Concentração Bactericida Mínima ( $\mu\text{M}$ ) das cordiaquinonas B, E, L, N e O em diversas estirpes bacterianas..... | <b>43</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                |  |
|----------------|--|
| <b>ANVISA</b>  | Agência Nacional de Vigilância Sanitária   |
| <b>CBM</b>     | Concentração Bactericida Mínima  |
| <b>CIM</b>     | Concentração Inibitória Mínima   |
| <b>CLSI</b>    | Do inglês: <i>Clinical Laboratory Standard Institute</i> , Instituto de Padrões Clínico-Laboratoriais.               |
| <b>DMSO</b>    | Dimetilsulfóxido   |
| <b>DPPH</b>    | 2,2-difenil-1-picrilhidrazil   |
| <b>ESBL</b>    | Do inglês: <i>Extended Spectrum Beta Lactamasis</i> , Beta-lactamases de Espectro Ampliado                           |
| <b>EROs</b>    | Espécies reativas de Oxigênio  |
| <b>FDA</b>     | Do inglês: <i>Food and Drug administration</i> , Administração de alimentos e drogas                                 |
| <b>IPCS</b>    | Infecções primárias da corrente sanguínea  |
| <b>LPS</b>     | Lipopolissacarídeo(s)  |
| <b>MEC</b>     | Matriz extracelular  |
| <b>MFA/AFM</b> | Microscopia de Força Atômica   |
| <b>MET</b>     | Microscopia Eletrônica de Transmissão  |
| <b>MRSA</b>    | Do inglês: <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina |
| <b>OMS</b>     | Organização Mundial da Saúde   |
| <b>QS</b>      | Do inglês: <i>Quorum sensing</i>   |
| <b>RMN</b>     | Ressonância Magnética Nuclear  |
| <b>SCCmec</b>  | do inglês, <i>staphylococcal cassette chromosome mec</i> , cassete cromossômico estafilocócico mec                   |
| <b>TBBQ</b>    | Terc-butil benzoquinona  |
| <b>TSB</b>     | do inglês, <i>Tryptical Soya Broth</i> , Caldo de soja tríptico  |
| <b>UFC</b>     | Unidade Formadora de Colônia   |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>12</b> |
| <b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>2.1 Infecções bacterianas</b> .....   | <b>14</b> |
| 2.1.1 Fatores de virulência de bactérias .....   | 15        |
| 2.1.2 Biofilmes .....  | 16        |
| 2.1.3 Gênero Staphylococcus .....  | 20        |
| <b>2.2. Agentes antibacterianos</b> .....  | <b>21</b> |
| 2.2.1 Mecanismos de ação de antibacterianos .....  | 22        |
| 2.2.2 Mecanismos de resistência a antimicrobianos .....  | 23        |
| 2.2.3 Produtos naturais como agentes antimicrobianos .....   | 25        |
| <b>2.3 Gênero Cordia e suas atividades biológicas</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>2.4 Cordiaquinonas, quinonas e suas atividades biológicas</b> .....                                 | <b>28</b> |
| <b>3 OBJETIVOS</b> .....   | <b>34</b> |
| 3.1 Geral.....   | 34        |
| 3.2 Específicos.....   | 34        |
| <b>4 MÉTODOS</b> .....   | <b>35</b> |
| 4.1 Delineamento experimental.....   | 35        |
| 4.3 Obtenção das cordiaquinonas.....   | 35        |
| 4.4 Estirpes utilizadas.....   | 36        |
| 4.5 Manutenção das estirpes bacterianas.....   | 36        |
| 4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) ..... | 36        |
| 4.7 Avaliação da atividade antibacteriana por meio da inibição da formação de biofilme .....           | 38        |
| 4.8 Estudos de mecanismo de ação .....   | 39        |
| 4.8.1 Microscopia de Força Atômica .....   | 39        |
| 4.9 Análise estatística .....  | 40        |
| <b>5 RESULTADOS</b> .....  | <b>41</b> |
| 5.1 Concentração inibitória mínima das cordiaquinonas B, E, L, N e O .....                             | 41        |
| 5.2 Concentração bactericida mínima das cordiaquinonas B, E, L e N .....                               | 42        |
| 5.3 Inibição da formação de biofilme.....  | 43        |
| 5.4 Alterações morfológicas detectadas por microscopia de força atômica .....                          | 45        |
| <b>6 DISCUSSÃO</b> .....   | <b>47</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO</b> .....   | <b>53</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | <b>54</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas, principalmente as causadas por bactérias, ainda são uma das principais causas de morte no mundo, de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2019). O combate às infecções bacterianas tem sido um desafio para a humanidade desde a antiguidade até os dias atuais, além disso, o crescente quadro de resistência a antibióticos vem contribuindo para uma necessidade cada vez maior de novos compostos com efeito antibacteriano (VENTOLA, 2015).

Os produtos naturais têm se mostrado uma excelente fonte para a descoberta de novos medicamentos ao longo dos anos, especialmente aqueles derivados de micro-organismos terrestres e plantas (PAN; HEE-BYUNG; KINGHORN, 2013). Um exemplo clássico de produto natural utilizado como agente antibacteriano é a penicilina, presente no fungo *Penicillium notatum*, tendo sido identificada por Alexander Fleming, em 1928. Sua descoberta desencadeou uma revolução no descobrimento de novos compostos com potencial antibacteriano derivados de produtos naturais (SINGH, 2014). A partir disso, diversos agentes antibacterianos, tais como  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, estreptograminas, também de origem natural, surgiram durante a chamada “era de ouro” dos antimicrobianos (WALSH; WENCEWICZ, 2014).

Outro exemplo de produto natural usado como agente antibacteriano são as quinonas. Sabe-se que as quinonas são substâncias biologicamente ativas, distribuídas amplamente nos organismos vivos e amplamente utilizadas em medicamentos, bem como reagentes químicos (ASCHE, 2005; MARINHO-FILHO et al., 2009; DE LUCAS; FERREIRA; NETTO-FERREIRA, 2014). Diversas atividades biológicas das quinonas já foram relatadas na literatura, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer, antifúngica e antibacteriana (DE OLIVEIRA et al., 2017; DEY; RAY; HAZRA, 2014; SREELATHA et al., 2014).

As cordiaquinonas são substâncias pertencentes à classe das quinonas, mais precisamente das naftoquinonas, extraídas de plantas do gênero *Cordia* (BIEBER et al., 1990; DINIZ et al., 2015). Esse gênero abrange cerca de 250 espécies, e apresenta larga distribuição, ocorrendo desde a América Central até a Argentina. As espécies deste gênero são utilizadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças que afetam humanos (OZA; KULKARNI, 2015; MATIAS et al., 2015).

Atividade antinociceptiva (BAYEUX et al., 2002), antioxidante, anti-inflamatória (SHARMA; ASATI, 2010), antifúngica e antibacteriana (SALAZAR-ARANDA et al., 2011), dentre outras, foram encontradas em estudos com plantas desse gênero.

As primeiras cordiaquinonas (A e B) foram isoladas e identificadas em 1990 por Bieber e colaboradores. Em seguida, outros estudos de isolamento, síntese em laboratório, e investigação de atividades biológicas foram realizados, sendo essas substâncias amplamente estudadas (BIEBER et al., 1990; BIEBER; KREBS; SCHÄFER, 1994; IOSET et al 1998, 2000; ARKOUDIS; STRATAKIS, 2008; FREITAS et al., 2012).

A crescente necessidade de novos agentes antibacterianos motiva o estudo de substâncias com potencial ação contra esses patógenos. O fato de outras naftoquinonas já terem atividade antibacteriana relatadas na literatura, bem como as cordiaquinonas terem se mostrado biologicamente ativas em estudos anteriores levam a acreditar no seu potencial antibacteriano. Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo investigar pela primeira vez a atividade antibacteriana das cordiaquinonas isoladas E, L, N e O, bem como da cordiaquinona B, obtidas de *Cordia polycephala*.

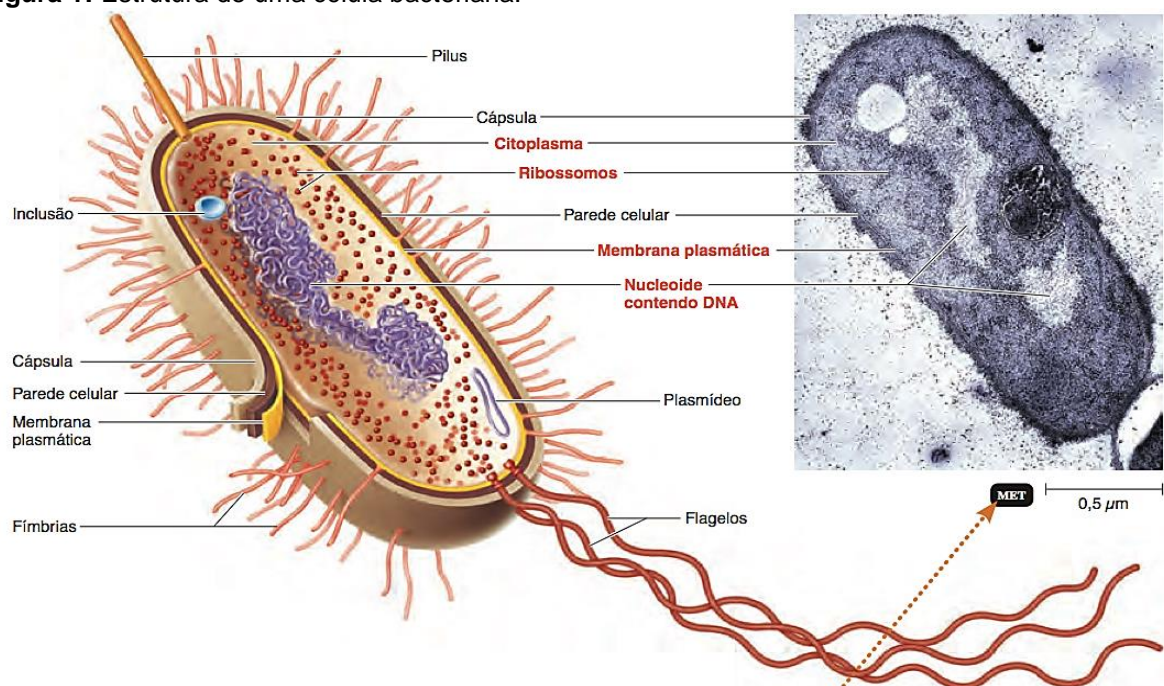
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Infecções bacterianas

As bactérias são seres unicelulares e procariontes, ou seja, não possuem membrana nuclear envolvendo seu material genético. Esses micro-organismos possuem uma parede celular que pode ser composta majoritariamente por peptidoglicanos ou lipopolissacarídeos (LPS), estão presentes em todos os ambientes, no entanto, apesar de possuírem uma ampla capacidade de colonizar hospedeiros, nem sempre são capazes de provocar doenças (BOWER; ROSENTHAL, 2006; HAY; MORIS-JONES, 2016)

As bactérias podem ser divididas em dois grupos principais (Gram-Positivas e Gram-negativas) de acordo com o seu padrão de coloração, que é baseado na composição de sua parede celular (TSUKATANI et al., 2011). A **figura 1** apresenta uma ilustração e uma fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão (MET), onde é possível observar a estrutura básica das bactérias. As estruturas marcadas em vermelho são encontradas em todas as bactérias como membrana plasmática, citoplasma e parede celular. As demais estruturas como cápsula, flagelos e plasmídeo não são comuns a todas as bactérias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

**Figura 1:** Estrutura de uma célula bacteriana.



Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

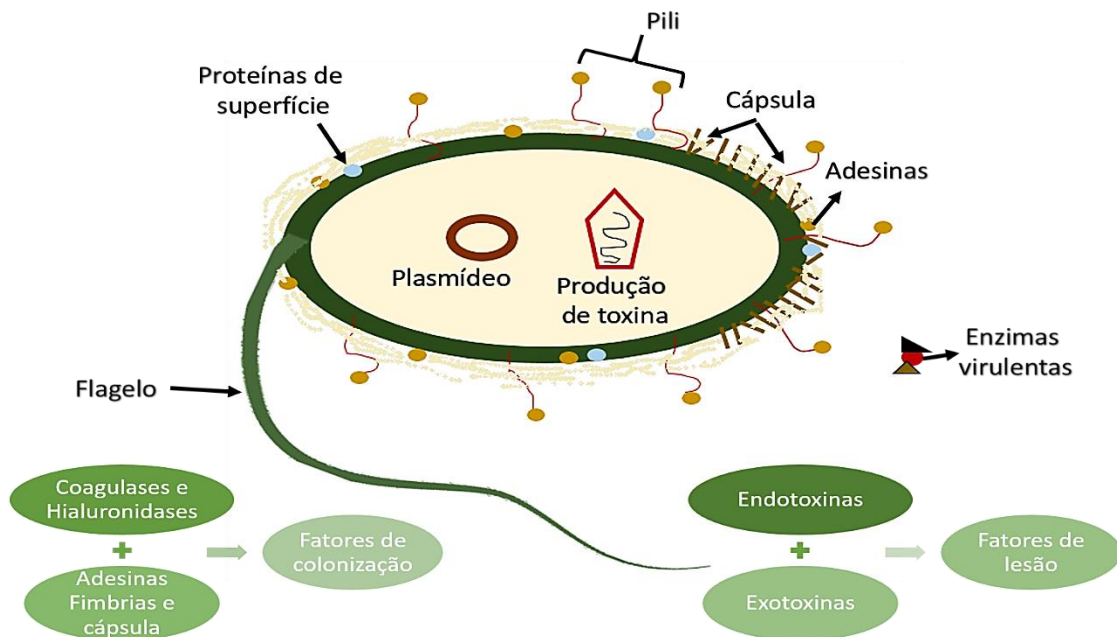


As infecções causadas por bactérias estão diretamente relacionadas com três das 10 principais causas de morte em todo o mundo, sendo elas as infecções do trato intestinal, infecções do trato respiratório inferior, bem como a tuberculose, de acordo com dados da OMS (WHO, 2018). Essas infecções são especialmente comuns em países em desenvolvimento, e podem ter relação com as condições socioeconômicas e sanitárias do local (DEY; RAY; HAZRA, 2014; PLÁCIDO et al., 2017).

### 2.1.1 Fatores de virulência de bactérias

A patogenicidade das bactérias está relacionada ao impacto acumulativo de fatores de virulência, que são úteis na diferenciação de estirpes patogênicas de não patogênicas (PUAH; CHUA; TAN, 2016). Como ilustrado na **figura 2**, os fatores de virulência podem ser divididos em dois tipos: os fatores de colonização, como as moléculas de adesão, ou adesinas, fímbrias, cápsulas, coagulases, hialuronidases, e os fatores de lesão, como as endotoxinas, que são componentes da estrutura das bactérias Gram-negativas, e exotoxinas, que são toxinas secretadas por algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SILVA et al., 2016).

**Figura 2:** Fatores de virulência de bactérias.



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA.

As adesinas são moléculas presentes na superfície das bactérias, sejam em forma monomérica ou filamentosa, que são capazes de se ligar a receptores presentes nas células dos hospedeiros, bem como a moléculas solúveis presentes no soro, mediando assim a entrada destas na célula (KLINE et al., 2009; OTTO, 2018). As fimbrias ou pili, também são fatores de virulência importantes no processo de adesão, uma vez que ajudam a superar a repulsão de cargas entre as células da bactéria e do hospedeiro, por vezes, com adesinas aderidas à sua extremidade (PROFT; BAKER, 2009; HAIKO; WESTERLUND-WIKSTROM, 2013).

As cápsulas bacterianas funcionam como um fator de proteção contra antibacterianos, uma vez que podem limitar a ligação e interação de alguns agentes à superfície das bactérias, e possíveis modificações na permeabilidade das membranas bacterianas (SILVA et al., 2016). Hialuronidases, coagulases, esfingomielinases e fosfolipases são exemplos de enzimas virulentas capazes que promover a quebra de determinados componentes da matriz extracelular e dos tecidos e dessa maneira auxiliam na invasão dos mesmos por patógenos (KADIOGLU et al., 2008; FLORES-DIAZ, 2016).

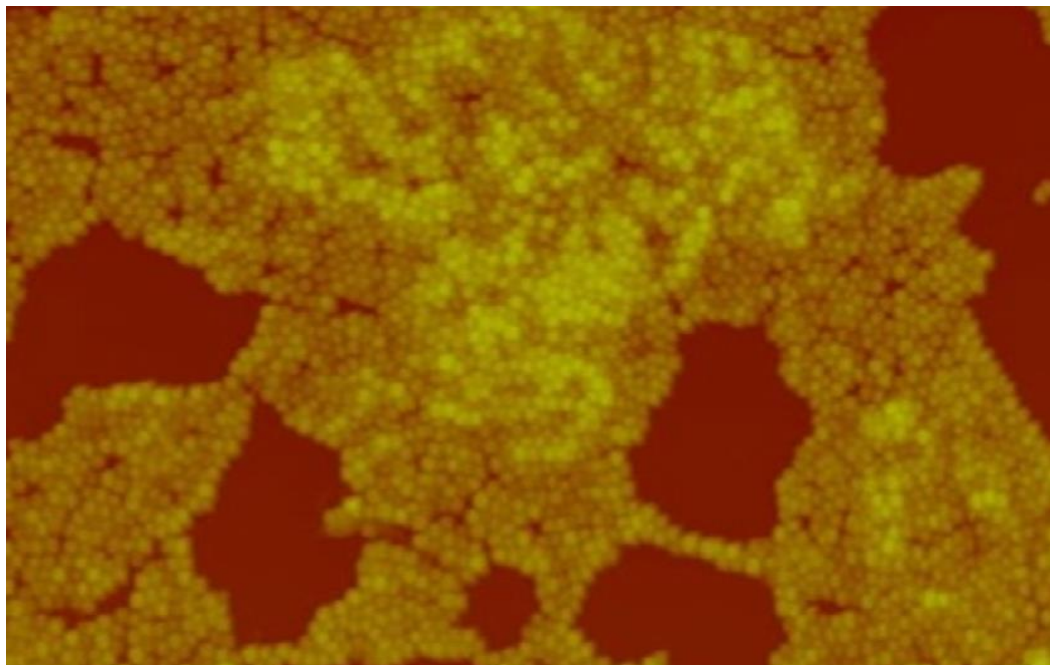
Endotoxinas são constituintes da membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas, também denominadas lipopolissacarídeos, capazes de induzir reações tóxicas no hospedeiro (HOLST et al., 1996; MALDONADO; SACORREIA; VALVANO, 2016). Essas moléculas são mais estáveis em altas temperaturas que as exotoxinas. Além disso, as exotoxinas não fazem parte da estrutura bacteriana, mas sim são secretadas pelas bactérias. Como exemplos, temos as toxinas colérica, tetânica, do choque tóxico estafilocócico, hemolisinas, entre outras, que podem causar dano de diferentes maneiras, como pela direta destruição da célula hospedeira, ou pela ativação exacerbada do sistema imune (CAVAILLON, 2017). Outro exemplo de exotoxina, presente em algumas espécies de *Staphylococcus* é a leucocidina Panton-Valentine, uma citotoxina que causa a destruição de leucócitos e necrose de tecidos, podendo levar à morte do hospedeiro (SHALLCROSS et al., 2013).

### 2.1.2 Biofilmes

As populações de bactérias apresentam uma capacidade de se comunicar e cooperar intra e inter-espécie, levando a alguns comportamentos como, por exemplo, a formação de biofilmes, um fator crítico para a persistência de infecções

bacterianas crônicas (KAVANOUGH et al., 2019). Os biofilmes podem ser definidos como uma comunidade fixa de micro-organismos, podendo ser formados a partir de uma única espécie ou da combinação de duas ou mais (HAWSER; DOUGLAS, 1994; LEUNG et al., 1998; OTTO, 2018). A **figura 3** apresenta uma imagem de microscopia de força atômica de um biofilme formado por *Staphylococcus aureus* em uma superfície de vidro. É possível observar inúmeras colônias fortemente agregadas entre si e aderidas à superfície.

**Figura 3:** Imagem de microscopia de força atômica (MFA) de um biofilme formado por *S. aureus* ATCC 25923 cultivado em caldo triptona de soja (TSB) aderido a uma superfície de vidro.



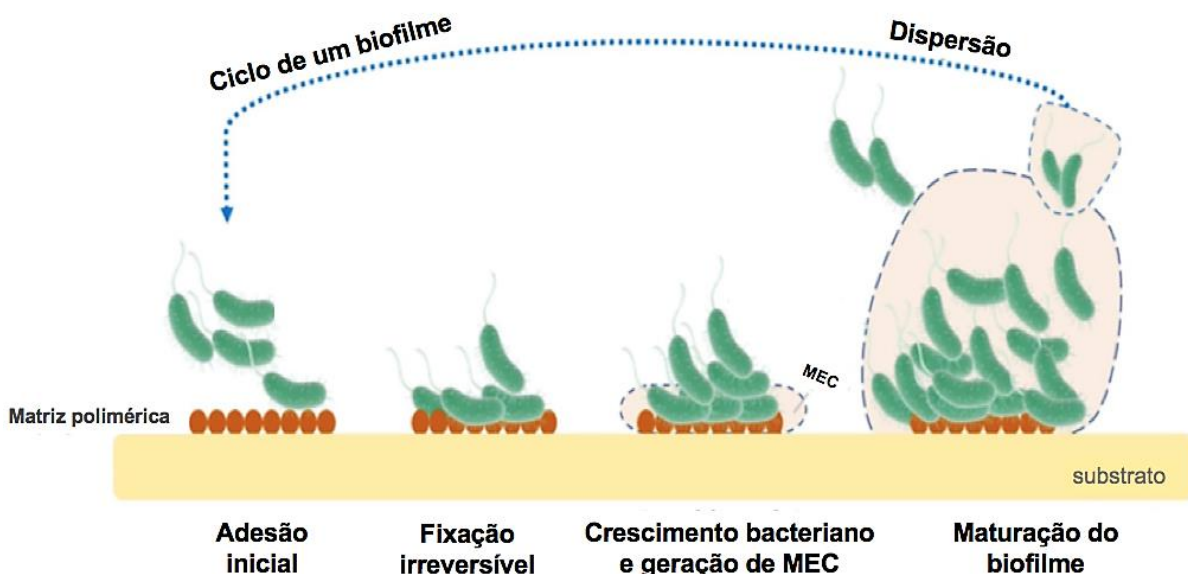
Fonte: ZMANTAR et al., 2017.

Biofilmes são uma forma natural e ubíqua de crescimento bacteriano, podendo ser formados diversas superfícies bióticas, tais como superfícies corporais animais e vegetais, ou abióticas, tais como lentes de contato, navios, laticínios e oleodutos, rochas em riachos e todas as variedades de implantes biomédicos e dispositivos transcutâneos (CARPENTIER; CERF, 1993; KANG; DIETZ; LI, 2019). Um biofilme possui três componentes principais: micro-organismos, fator crucial para sua formação, uma superfície para aderência dos mesmos, e um ambiente, , chamado de matriz extracelular (MEC), composta por diversos polímeros, tais como

proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e polissacarídeos, que facilitam a fixação irreversível das bactérias (AGARWAL; SINGH; JAIN, 2010).

A formação do biofilme se dá em quatro estágios: a fixação inicial, com a adesão do micro-organismo à superfície, a formação de colônias e a fixação irreversível, a maturação do biofilme através do crescimento bacteriano e geração de MEC, e finalmente a dispersão de bactérias para novos nichos (LU et al., 2019). A **figura 4** demonstra esses quatro estágios do ciclo de um biofilme.

**Figura 4:** Formação de um biofilme.



As quatro etapas da formação de um biofilme. MEC: matriz extracelular.  
Fonte: Adaptado de LU et al., 2019.

Outro fator crucial para os biofilmes é o *quorum sensing* (QS). Essa forma de comunicação entre micro-organismos permite que as bactérias reconheçam a densidade populacional através da detecção da acumulação de moléculas sinalizadoras específicas, secretadas pela comunidade. Essas moléculas são capazes de alterar a expressão gênica bacteriana e ativar respostas cooperativas, bem como genes que codificam um diversos fatores de virulência, como exoenzimas, proteases e elastases (ABISADO et al., 2018; LU et al., 2019).

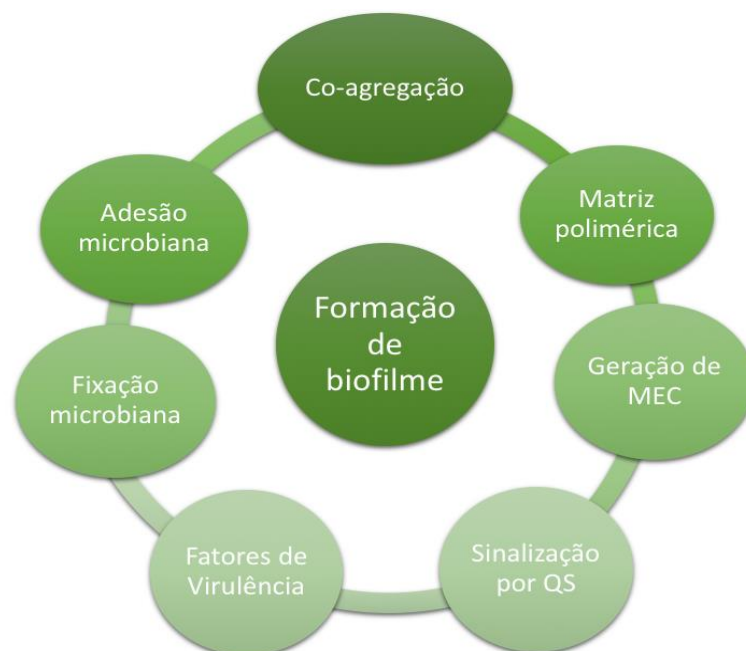
Uma vez estabelecidos, os biofilmes são capazes de se proteger contra a resposta imune do hospedeiro e se tornam extremamente difíceis de serem combatidos (WANG et al., 2009). Além disso, a habilidade de formar biofilmes complica o tratamento medicamentoso dessas infecções, uma vez que o biofilme dificulta a difusão de antibióticos, possuindo uma taxa de tolerância de 10 a 1000

vezes maior a antibióticos e desinfetantes, o que pode estar relacionado, por exemplo, ao aumento da ativação de mecanismos de resistência aos mesmos, bem como maior facilidade de transmissão dos genes relacionados com essa resistência (STREMPEL; STREHMEL; OVERHAGE, 2015; RAVAL et al., 2019).

Os fungos e/ou bactérias presentes em biofilmes possuem características alteradas, como taxas de metabolismo bacteriano e de transcrição gênica, o que promove mudanças fisiológicas no crescimento das bactérias. Propriedades específicas dos biofilmes, como a fase fisiológica estacionária, o baixo crescimento bacteriano, além da ligação de antibióticos aos componentes da matriz extracelular dos biofilmes, contribuem para a maior resistência dos mesmos aos antibióticos (FOSTER, 2005; STREMPEL; STREHMEL; OVERHAGE, 2015).

Diversos agentes capazes de inibir a formação de biofilmes ou eliminar o biofilme formado já foram descritos na literatura, no entanto, nenhum medicamento antibiofilme foi aprovado para comercialização até o momento. Esses agentes podem atuar de diversas formas, conforme descrito na **figura 5**, principalmente na supressão da aderência a superfícies e adesão intercelular, na inibição da matriz polimérica e da geração de MEC, bem como interferindo na Coagregação bacteriana e a rede QS (LU et al., 2019).

**Figura 5:** Alvos de agentes inibidores da formação de biofilmes.



Fatores importantes para a formação de biofilmes que podem ser alvos de agentes inibidores.  
Fonte: AUTORIA PRÓPRIA.

### 2.1.3 Gênero *Staphylococcus*

Entre os principais patógenos causadores de infecções bacterianas é possível destacar o gênero *Staphylococcus*. Esse gênero é caracterizado por uma elevada patogenicidade, bem como por ser capaz de colonizar diversos tecidos, e assim causar uma grande variedade de doenças (GIL et al., 2005; ARAUJO et al., 2015), tais como, infecção do trato urinário, de pele e mucosas, intoxicações alimentares, infecções do trato respiratório, como pneumonia, além de infecções primárias da corrente sanguínea (IPCS), podendo causar infecções fatais em crianças (MOSQUERA et al., 2019) e adultos (FRAZEE et al., 2005; GOTLAND et al., 2016)

Estafilococos são os patógenos mais comuns em casos de bacteremia, endocardite e sepse (XIANG et al., 2017). Em 2015, no Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), foram notificados 22.499 casos de IPCS em pacientes adultos de UTI, sendo o gênero *Staphylococcus* predominante entre os micro-organismos causadores identificados (29,7% dos casos) (ANVISA, 2016). Especula-se que essas bactérias sejam as maiores causadoras de morbidade e mortalidade entre os agentes infecciosos (VAN HORN et al., 2014).

A elevada patogenicidade das bactérias desse gênero se deve principalmente à sua habilidade de produzir toxinas, tais como hemolisinas, enterotoxinas, coagulases e toxina-1 da síndrome do choque tóxico (LEE et al., 2016), além de proteínas de adesão, que facilitam a colonização de tecidos. Algumas espécies, como *S. aureus* e *S. epidermidis*, são capazes de aderir e formar biofilmes em diversas superfícies como cateteres, implantes, próteses e equipamentos médicos, sendo a mais importante causa de infecção associada ao uso desses dispositivos (ZMANTAR et al., 2017).

Diversas espécies do gênero *Staphylococcus* também são conhecidas por apresentarem resistência a antibióticos o que dificulta o tratamento dessas infecções (BOCE et al., 2019). De acordo com o CDC (do inglês: *Center for Disease Control*, Centro para o Controle de Doenças) MRSA (do inglês: *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina) contribuem com mais da metade das mortes por resistência a antibióticos (CDC, 2013). MRSA são uma das predominantes causas de infecções nos serviços de saúde (MOSQUERA et al., 2019), mas nos últimos anos, uma mudança nesse perfil vem acontecendo, e esses patógenos também vem se tornando frequentes na

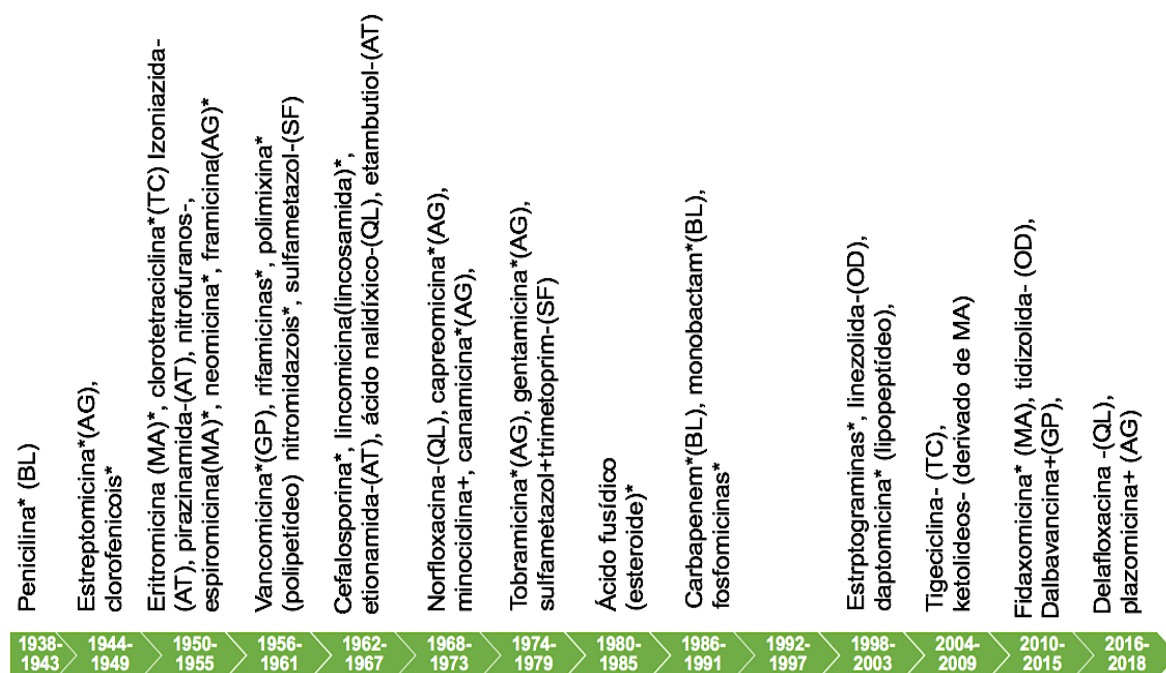


comunidade (VINDEL et al., 2014), tornando cada vez mais necessário o desenvolvimento de compostos para combater as infecções causadas pelos mesmos.

## 2.2. Agentes antibacterianos

O tratamento usual para infecções bacterianas é a administração local ou sistêmica de antibióticos (LOS et al., 2013). A descoberta dos antibióticos trouxe uma revolução no tratamento das infecções bacterianas, uma vez que essas eram responsáveis por milhões de mortes antes da descoberta dos mesmos (SAVOIA, 2012). A **figura 6** apresenta o histórico da introdução no mercado das diferentes classes de agentes antibacterianos aprovados pelo FDA (do inglês: *Food and Drug Administration*, Administração de alimentos e drogas, EUA). O período de 1940 a 1960 foi considerado a “era de ouro” dos antimicrobianos, tendo início com a produção da penicilina. Com o passar dos anos, no entanto, houve uma diminuição da introdução de novos medicamentos antibióticos, com cerca de 10 anos sem que nenhum antibiótico tenha sido aprovado (DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2018).

**Figura 6:** Histórico da aprovação de antibióticos.



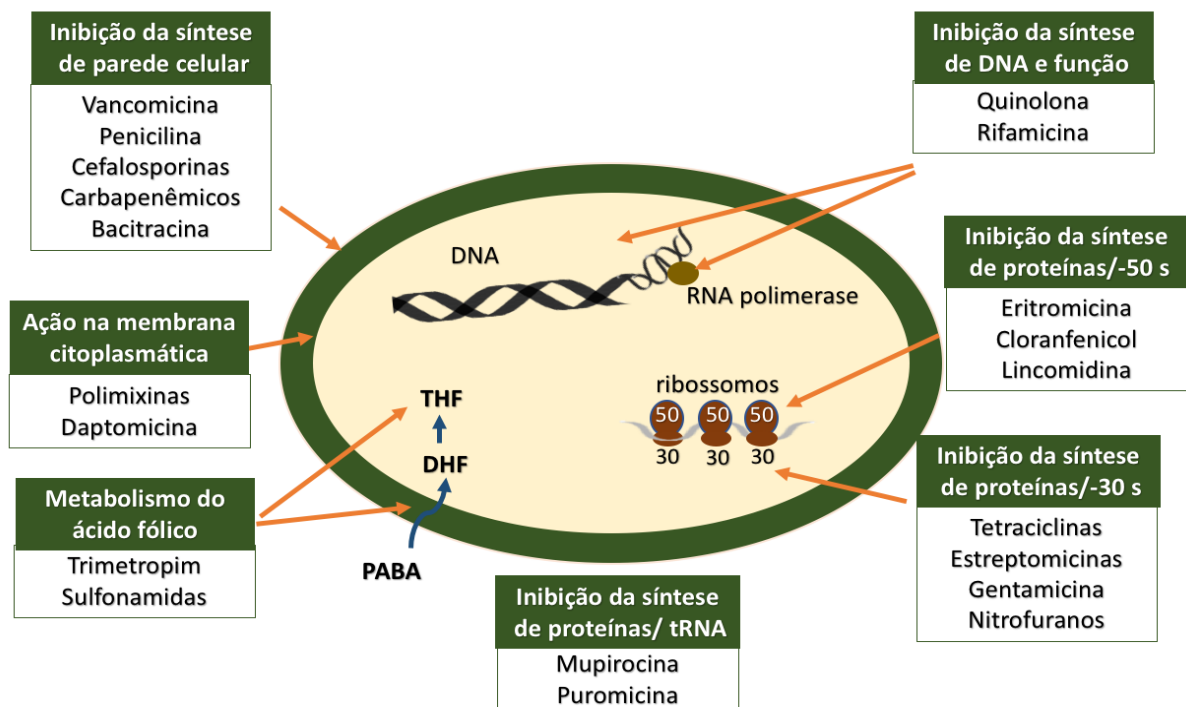
Antibióticos aprovados pelo FDA(EUA) no período de 1938 a 2018. \*Produto natural; - sintético; +semi-sintético. BL ( $\beta$ -Lactâmico); AG (Aminoglicosídeo); MA (Macrolídeo); TC (Tetraciclina); AT(Antituberculose); GP (Glicopeptídeo); SF (Sulfonamida); QL (Quinolona); OD (Oxazolidinonas). Fonte: Adaptado de DURAND et al., 2018.

A descoberta de novos agentes antibacterianos tem falhado em acompanhar o rápido desenvolvimento de resistência pelos micro-organismos (ABREU; McBAIN; SIMOES, 2012). O custo elevado é um fato contribuinte para a diminuição no investimento da indústria farmacêutica para o desenvolvimento e comercialização de novos agentes. De fato, embora uma grande quantidade de substâncias com potencial antibacteriano tenha sido publicada na literatura nos últimos cinco anos, apenas 12 foram aprovados para a fase de testes clínicos e cinco para venda pelo FDA (FDA, 2019).

### 2.2.1 Mecanismos de ação de antibacterianos

A atividade dos antibióticos ocorre por diversos mecanismos de ação, podendo agir inibindo o crescimento bacteriano ou levar à morte da bactéria. Entre os mecanismos de ação destacam-se a inibição da síntese da parede celular; a fragmentação da membrana celular, inibição da síntese de proteínas, inibição da síntese de ácidos nucleicos e inibição do metabolismo bacteriano (BBOSA et al., 2014). A **figura 7** apresenta os mecanismos de ação de diversas classes de antibióticos e seus alvos na célula bacteriana.

**Figura 7:** Mecanismos de ação dos agentes antibacterianos.



Fonte: Adaptado de BBOSA et al., 2014.



A parede celular das bactérias é formada por uma macromolécula denominada, peptidoglicano. A camada de peptidoglicano confere força e resistência às bactérias, e necessitam da ação das enzimas biofuncionais contendo domínios transpeptidase e transglicosilase. Essas enzimas são os alvos dos medicamentos denominados  $\beta$ -lactâmicos, como as penicilinas e cefalosporinas, que agem como pseudo-substratos para essas enzimas e acetilam os seus sítios ativos. A vancomicina também atua impedindo a síntese da parede celular bacteriana, mas em vez de se ligarem às enzimas que a sintetizam, se ligam aos substratos peptídicos, impedindo que os mesmos se liguem às enzimas (FERNANDES; MARTENS, 2017).

Os ribossomos responsáveis pela síntese proteica em bactérias são bastante diferentes dos presentes nas células eucarióticas. Dessa maneira, estes funcionam como alvo de diversos inibidores da síntese de proteínas bacterianas, possuindo atividade antibacteriana seletiva. As tetraciclina, eritromicina e os aminoglicosídeos são exemplos de antibióticos amplamente utilizados na clínica que inibem a síntese de proteínas (BROWN; LISTER; MAY-DRACKA, 2014). Outros antibióticos, como as quinolonas, promovem a morte celular bacteriana atuando na enzima DNA girase, fundamental para a replicação do DNA das células (EHMANN; LAHIRI, 2014).

### *2.2.2 Mecanismos de resistência a antimicrobianos*

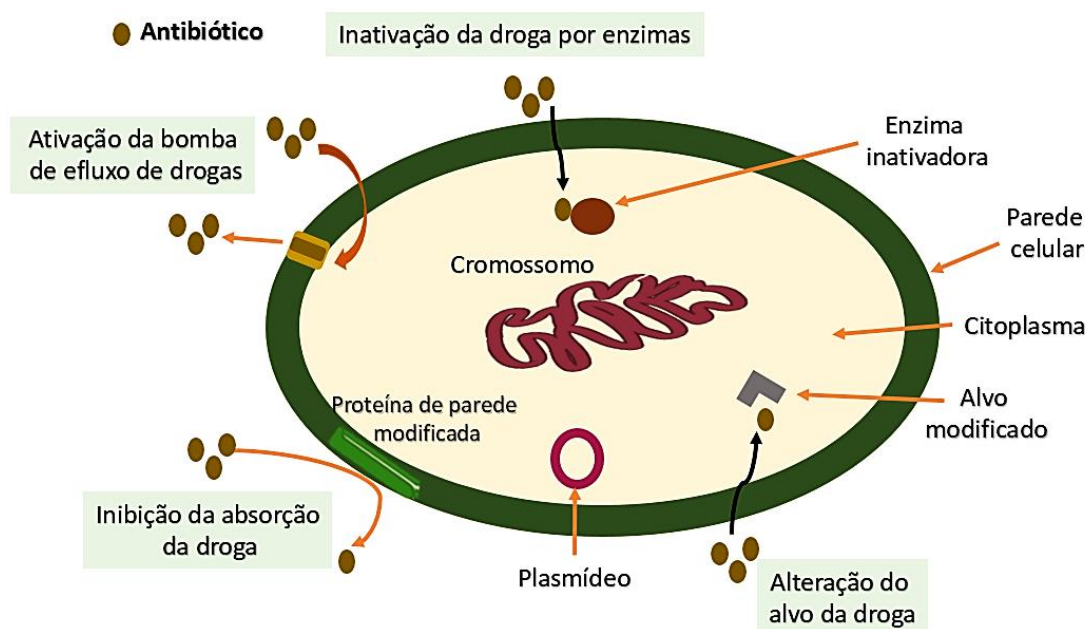
O uso excessivo de antibióticos é bastante comum em muitos países, podendo exercer uma pressão seletiva em estirpes multirresistentes de bactérias patogênicas, e culminar no aumento da circulação das mesmas (LOS et al., 2013). Sabe-se que a resistência a antibióticos é um forte agravante de infecções bacterianas, mas seus impactos vão além e afetam outros setores, como a economia, uma vez que o custo financeiro de uma terapia fracassada devido a bactérias resistentes é bastante elevado. Nos Estados Unidos, por exemplo, o custo estimado dos gastos com a resistência bacteriana é de cerca de 4 a 5 bilhões de dólares por ano (DEL FIOLE et al., 2010). Além disso, existe o impacto da redução de produtividade causada pela doença tanto em seres humanos como em animais (ANVISA, 2016).

Os diversos mecanismos de resistência aos antibióticos incluem: enzimas que inativam o agente, o uso de outras vias metabólicas, que não a alvo do antibiótico,

modificação no alvo do antibiótico, diminuição da entrada do agente antibacteriano na célula, efluxo do agente para fora da célula, aumento da produção do alvo do antibiótico (KEYES; LEE; MAURER, 2008). A **figura 8** apresenta os principais mecanismos de resistência a antibacterianos. O exemplo mais conhecido de resistência a antibióticos é a produção de enzimas hidrolíticas, conhecidas como  $\beta$ -lactamase, que são capazes de desativar o anel  $\beta$ -lactâmico de penicilinas e cefalosporinas, por meio de modificações estruturais, impedindo que estas moléculas funcionem como pseudosubstrato para transpeptidases e transglicosilases, perdendo seu poder antibiótico (SINGH, 2014).

Algumas bactérias se tornaram resistentes à tetraciclina por meio da produção de proteínas que funcionam como bombas de efluxo, ou seja, com a capacidade de exportar o antibiótico, impedindo a sua acumulação no citoplasma, necessária para que o mesmo consiga inibir a síntese proteica. Já algumas bactérias desenvolveram um mecanismo que permitiu modificar um resíduo específico na unidade 23S do RNA bacteriano, diminuindo a afinidade dos antibióticos da classe das eritromicinas pelo ribossomo das bactérias (FERNANDES; MARTENS, 2017).

**Figura 8:** Mecanismos de resistência a antibacterianos.



Fonte: Adaptado de BBOSA et al., 2014.

Nesse contexto, a resistência à metilina merece destaque, uma vez que MRSA são uma das principais causas de mortalidade em razão da resistência a antibióticos (VAN HORN et al., 2014). A resistência à metilina se deve principalmente à presença do gene *mecA*, que codifica uma proteína alternativa de ligação à penicilina (PBP2a) que tem baixa eficiência de acetilação por  $\beta$ -lactâmicos, o que impede a ação dos mesmos. O gene *mecA* é transportado dentro de um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) (VINDEL et al., 2014).

Este elemento genético móvel é composto de dois elementos principais, o complexo *mec* contendo *mecA* e formas intacta e deletada de seus reguladores (*mecI*, *mecR1*) e o complexo *ccr* composto por recombinases cromossômicas em cassete (*ccr*) que estão envolvidas na mobilidade do complexo. As porções restantes do SCC*mec* apresentam componentes não considerados essenciais, chamados de genes adicionais, que conferem resistência a metais e antibióticos, bem como genes de função desconhecida, que são chamadas de regiões J (KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2000; MIRAGAIA, 2018).

As bactérias podem adquirir resistência, tanto de forma vertical, quando herdam o gene de resistência da célula progenitora, ou de forma horizontal, quando adquirem o gene de outra bactéria, dentro da mesma espécie ou de espécies diferentes. Essa habilidade de compartilhar genes de resistência dificulta ainda mais o tratamento das infecções bacterianas, tornando cada vez mais necessária a busca de novos agentes para combater as mesmas (ABREU; McBAIN; SIMOES, 2012). Nesse contexto, os produtos naturais, amplamente utilizados no combate a diversas doenças, incluindo as causadas por bactérias (SAVOIA, 2012), podem se apresentar como uma boa alternativa nessa busca por antibacterianos, que sejam capazes de combater bactérias com tais habilidades.

### *2.2.3 Produtos naturais como agentes antimicrobianos*

Devido a sua alta complexidade, diversidade molecular, e fácil obtenção de produtos, a natureza tem sido uma fonte de medicamentos por milênios, sendo os primeiros registros datados de 2.600 a.C do uso de plantas com propriedades medicinais (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Com o passar dos anos, e o desenvolvimento da ciência e da medicina, as plantas, bem como outros seres vivos, vieram a ser utilizados como fonte do

desenvolvimento de muitas drogas úteis, tais como a penicilina (antibiótico), o taxol (anticâncer) e artemisina (antimalária), ressaltando a importância dos produtos naturais como fonte de medicamentos até os dias atuais (AHMAD; WAJID, 2013).

Por se tratar de uma fonte de uma ampla quantidade de compostos, a natureza tem sido intensamente investigada, levando à descoberta de diversos metabólitos secundários, que agem como mediadores químicos entre a planta e o meio ambiente, e atuam na proteção da mesma. Exemplos são os flavonoides, taninos, fenóis e quinonas. Tais compostos, além de conferirem características como odor e pigmentação à planta, também aumentam a capacidade da mesma de combater doenças infecciosas microbianas (DEY; RAY; HAZRA, 2014; DOS SANTOS et al., 2014).

Esses compostos possuem ainda grande potencial farmacológico devido às atividades biológicas apresentadas por eles. Essas atividades biológicas de substâncias obtidas de plantas podem estar relacionadas, entre outros mecanismos, com a inibição de determinadas moléculas, entre elas, proteínas. Tais substâncias continuam sendo fontes valiosas de compostos para o descobrimento de novas drogas (MIRANDA et al., 2015).

Os produtos naturais, originados de plantas, bem como de outros seres vivos, têm sido uma rica fonte de drogas antimicrobianas por muitas décadas (BROWN; LISTER; MAY-DRACKA, 2014). De fato, 69% das drogas contra agentes infecciosos, incluindo fungos, bactérias, vírus e parasitas são derivados de produtos naturais ou baseados nos mesmos. Essa mesma proporção se aplica aos antibacterianos aprovados no período de 1981 a 2006. Dos 109 novos compostos, 69% foram originados de produtos naturais (NEWMAN, 2008; CRAG; NEWMAN, 2013).

O potencial antimicrobiano de produtos naturais tem estimulado estudos de investigação dessa atividade biológica. Extratos de plantas de mais de 157 famílias apresentaram potencial atividade antimicrobiana. Esse efeito antimicrobiano de extratos, bem como óleos de planta tem sido amplamente utilizado, incluindo a conservação de alimentos e o uso como terapias alternativas (NARAYAN et al., 2010).

O crescente surgimento de patógenos resistentes e a necessidade de novos antibióticos têm motivado estudos sobre o potencial antibacteriano de substâncias originadas de plantas (ABREU; MCBAIN; SIMOES, 2012). Além disso, a ampla diversidade de compostos químicos, bem como o relativo fácil acesso às mesmas é

um fator que contribui para que as plantas continuem a ser uma importante fonte para a pesquisa e desenvolvimento de agentes antibacterianos (SAVOIA, 2012).

### 2.3 Gênero *Cordia* e suas atividades biológicas

O gênero *Cordia* possui cerca de 250 espécies, com ampla distribuição nos países tropicais, e é composto por três subgêneros: *Varronia* (L), *Cordia* (L) e *MyxaTaroda*, sendo este último subdividido em três seções: seção *Myxa* (Endl.) D.C., seção *Gerascanthus* (Brousne) Don. e seção *Superbiflorae Taroda* (TARODA; GIBBS, 1987).

Diversas atividades biológicas de compostos obtidos de espécies desse gênero foram investigadas por uma ampla variedade de métodos, sendo relatadas atividades como antimicrobiana (NARIYA et al., 2011), anti-inflamatória (BAYEUX et al., 2002), antiulcerogênica (AKHTAR; AHMAD, 1995) e antioxidante (AL-MUSAYEIB et al., 2011). Além disso, estudos fitoquímicos culminaram na identificação de metabólitos secundários de diversas espécies do gênero *Cordia* (OZA; KULKARNI, 2017).

Entre as atividades biológicas de espécies do gênero *Cordia* destaca-se a atividade antibacteriana. Salazar-Aranda e colaboradores (2011) investigaram a atividade antibacteriana de extratos de *C. boissierie* contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*, bem como contra estirpes sensíveis e resistentes a antibióticos de *Staphylococcus aureus* e observaram ação antimicrobiana do mesmo.

Nos estudos de Panghal e colaboradores (2011) e Pinhol e colaboradores (2012), extratos *C. dichotoma* também apresentaram efeito antibacteriano contra *S. aureus*. Nariya e colaboradores (2011) também encontraram atividade antibacteriana de extratos de *C. dichotoma* contra *E. coli* e *P. aeruginosa*. O estudo de Pinhol e colaboradores (2012) também forneceram dados de ação de extratos de *C. verbenacea* contra *S. aureus*. Meccia e colaboradores (2009) investigaram a composição fitoquímica e o potencial antibacteriano do óleo essencial de *Cordia verbenacea* e encontraram atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

No entanto, algumas espécies tem o potencial etnofarmacológico ainda pouco explorado, como é o caso da *C. polycephala*, conhecida popularmente como “maria

preta”. Essa planta se caracteriza como um pequeno arbusto, de caule em forma cilíndrica, apresentando poucos galhos, de pequena espessura. Suas folhas apresentam pecíolo curto e lâminas lanceoladas. Suas flores se caracterizam como uma inflorescência em capítulos, com raízes finas, laterais e rasas, florescendo entre os meses de novembro a junho. Seus frutos possuem coloração avermelhada (**figura 9**) e pouco sabor. Essa espécie pode ser encontrada na Espanha e em diversos países da América do Sul, incluindo o Brasil, sendo encontrado nas regiões Norte, Nordeste, Centro–Oeste e Sudeste do país, geralmente em florestas (LEITE, 2006; FREITAS, 2010).

**Figura 9:** Fotos de *Cordia polycephala*.



(A) Aspecto da planta inteira; (B) Folhas e inflorescência; (C) Fruto.  
Fonte: FREITAS (2010).

#### **2.4 Cordiaquinonas, quinonas e suas atividades biológicas**

As quinonas são uma classe de moléculas cíclicas, derivadas de compostos aromáticos, com dois grupos carbonila (C=O) em um anel benzênico. Estão presentes de forma ubíqua na natureza e compõem uma grande classe de compostos naturais encontrados em fungos, plantas e bactérias (MADEO; ZUBAIR; MARIANNE, 2013). Esses compostos, juntamente com os taninos, são responsáveis pelos pigmentos de coloração, bem como auxiliam na defesa do hospedeiro contra possíveis patógenos. (DEY; RAY; HAZRA, 2014). Além disso, desempenham um papel fundamental no

metabolismo aeróbio das células, e são essenciais para inúmeros processos enzimáticos e bioquímicos necessários para os seres vivos (DE OLIVEIRA et al., 2017).

As quinonas podem ser classificadas de acordo com a posição do grupo carbonila em 1,2 ou orto-quinonas (carbonilas adjacentes) e 1,4 ou para-quinonas (separadas por dois carbonos). Além disso, as quinonas podem ser classificadas de acordo com o composto aromático que a originou, por exemplo, se for originada de um benzeno, trata-se de uma benzoquinona, de naftaleno, uma naftoquinona, de antraceno, uma antraquinona, e assim por diante (DE LUCAS; FERREIRA; NETTO-FERREIRA, 2014).

As quinonas são conhecidas por serem biologicamente ativas, ou seja, são capazes de interagir com as moléculas dos organismos e promoverem modificações nas mesmas. A interação entre a estrutura das quinonas e demais moléculas podem ser tanto essenciais para o funcionamento do organismo, como também podem causar danos nessas moléculas, como DNA e proteínas. As quinonas têm sido amplamente estudadas e particularmente úteis no *design* racional de drogas (MADEO; ZUBAIR; MARIANNE, 2013).

Diversos medicamentos quimioterapêuticos são originados de quinonas, como por exemplo, mitomicina C, mitoxantrona, daunorubicina e valrubicina utilizados no tratamento de câncer de mama, pulmão e ovário. Além disso, quinonas produzidas naturalmente como a plumbagina, aloe-emodina, juglona, lapachol, menadiona, cribrostatina também apresentaram efeito citotóxico contra células tumorais (LEE et al., 2006; LU et al., 2013; SREELATHA et al., 2014).

No entanto, algumas quinonas podem ser tóxicas para os indivíduos, como por exemplo, as antraquinonas aloe-emodina, crisofanol e emodina, que apresentaram genotoxicidade. (PANIGRAHI et al., 2018). Em contraste, De Oliveira e colaboradores (2017) verificaram que naftoquinonas derivados de *Lawsonia* apresentaram efetiva atividade antioxidante utilizando o ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Esses dados reforçam que as quinonas possuem um duplo efeito nos organismos, devido ao seu potencial de oxirredução, elas podem tanto ser citotóxicas através da geração dessas EROs, como ter ação antioxidante, sendo o efeito final diretamente relacionado com a dose administrada, bem como os alvos que podem interagir com as mesmas (BOLTON; DUNLAP, 2016). Além disso, as quinonas também podem atuar na proteção contra a inflamação, uma vez que Woo

e colaboradores (2017) relataram a ação anti-inflamatória da 2-carbometoxi-2,3-epoxi-3-prenil-1,4-naftoquinona (CMEP-NQ).

Atividades antimicrobiana e antiparasitária também são comuns às quinonas. Santos e colaboradores (2010) avaliaram também o potencial antifúngico de duas quinonas contra diversas estirpes de *Candida* sp. Suto e colaboradores (2015) realizaram um estudo para avaliar o efeito antitripanosoma de derivados de quinonas, e encontraram toxicidade contra o parasita, mas não contra células de mamíferos. Crosby e colaboradores (2010) descreveram a atividade antiviral de análogos da conocurvona contra HIV, enquanto Mello e colaboradores (2016) avaliaram o potencial antiviral contra HSV-1 de diferentes aminometilnaftoquinonas.

Diversos estudos envolvendo a atividade antibacteriana de quinonas já foram relatados na literatura. Sreelatha e colaboradores (2014) a maioria dos compostos testados se mostrou ativa contra MRSA, mas inativa contra *P. aeruginosa*. Dey, Ray e Hazra (2014) reportaram a ação antimicobacteriana de cinco compostos quinonoides (emodina, diospirina, plumbagina, menadionea e timoquinona) contra diferentes estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*.

Atividades antitoxoplásmica (PEARSON et al., 1999), antiplasmódica (LACY et al., 2002) da naftoquinona atovaquona e antileishmania da buparvaquona (GARNIER et al., 2007) também foram descritas. Além disso, Ribeiro e colaboradores (2009) avaliaram o efeito larvicida (contra *Aedes aegypti*) e moluscida (contra *Biomphalaria glabrata*) de diversas naftoquinonas naturais e sintéticas, encontrando resultados significativos.

Em relação às cordiaquinonas, essas substâncias foram descritas pela primeira vez por Bieber e colaboradores (1990) quando isolaram as cordiaquinonas A e B das raízes da planta *Cordia corymbosa*. Da Silva Filho e colaboradores (1993) avaliaram as atividades antifúngica, anticâncer e antibacteriana dessas cordiaquinonas, encontrando efeito das mesmas contra 14 fungos patogênicos. Em seguida, Bieber, Krebs e Schäfer (1994) isolaram e determinaram a estrutura de mais outros dois compostos pertencentes a esse mesmo grupo, as cordiaquinonas C e D.

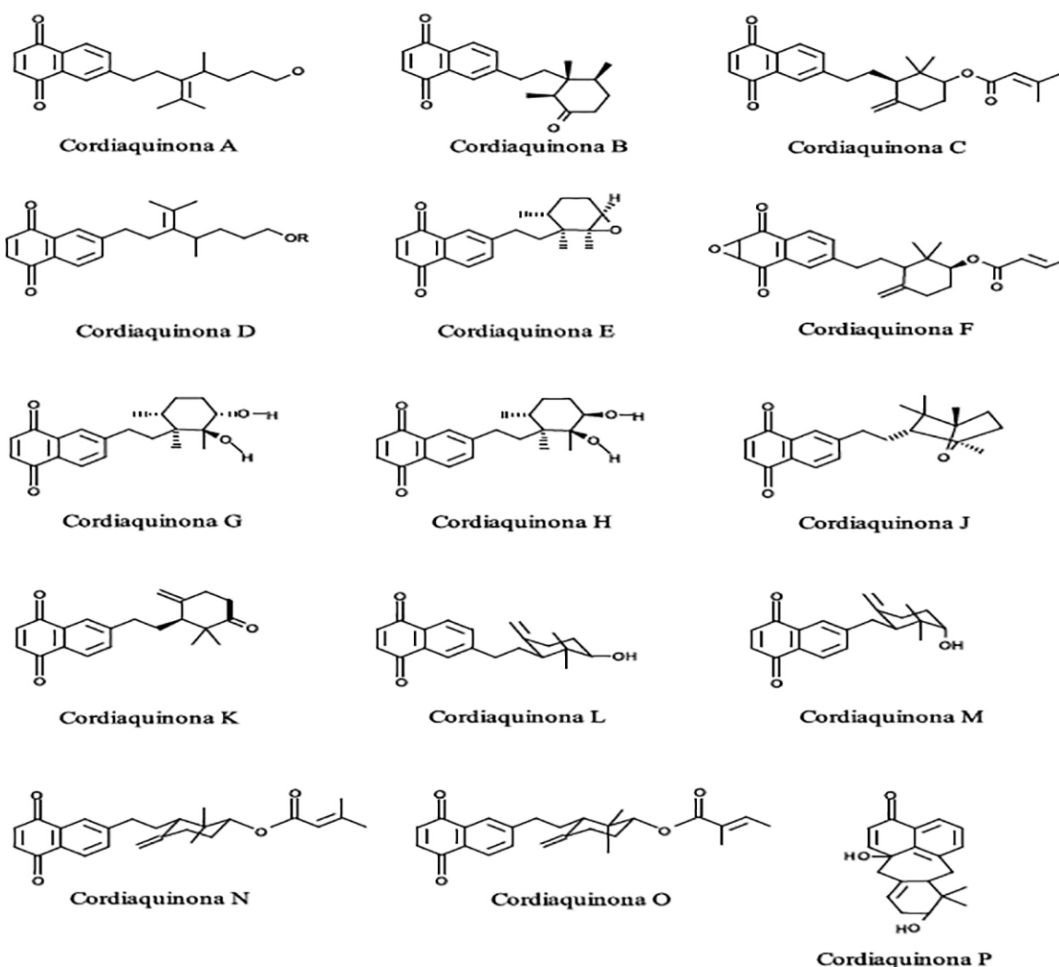
Em 1996, Kuramochi e colaboradores relataram pela primeira vez a síntese total da cordiaquinona B. Posteriormente, loset e colaboradores (1998) isolaram e identificaram as novas cordiaquinonas E, F, G, bem como a cordiaquinona B das raízes de *Cordia linnaei* que apresentaram boa atividade antifúngica e larvicida. Em



2000, Ioset e colaboradores extraíram e isolaram as cordiaquinonas já conhecidas A e B, bem como cordiaquinonas inéditas (J e K) das raízes de *Cordia curassavica*, que também apresentaram potencial fungicida e larvicida.

Estudos realizados por Marinho-Filho e colaboradores (2010; 2012) comprovaram a participação do estresse oxidativo nos efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo* da cordiaquinona J. Freitas e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antitumoral das cordiaquinonas B, E, L, N e O, além de isolar e elucidar as estruturas das cordiaquinonas N e O. Oliveira e colaboradores (2012) quantificaram por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as cordiaquinonas J, L e M presentes em *C. leucocephala*. Diniz e colaboradores (2015) isolaram e identificaram a cordiaquinona P da mesma espécie. A **figura 10** apresenta as estruturas das cordiaquinonas já identificadas.

**Figura 10:** Estrutura das cordiaquinonas relatada na literatura.



Fonte: Adaptado de ARKOUDIS; STRATAKIS, 2008; DINIZ et al., 2009; 2015; FREITAS et al., 2012.

A **tabela 1** descreve os estudos com cordiaquinonas em ordem cronológica, especificando autores, a(s) cordiaquinona(s) estudada(s), origem da substância e atividade biológica, quando testada.

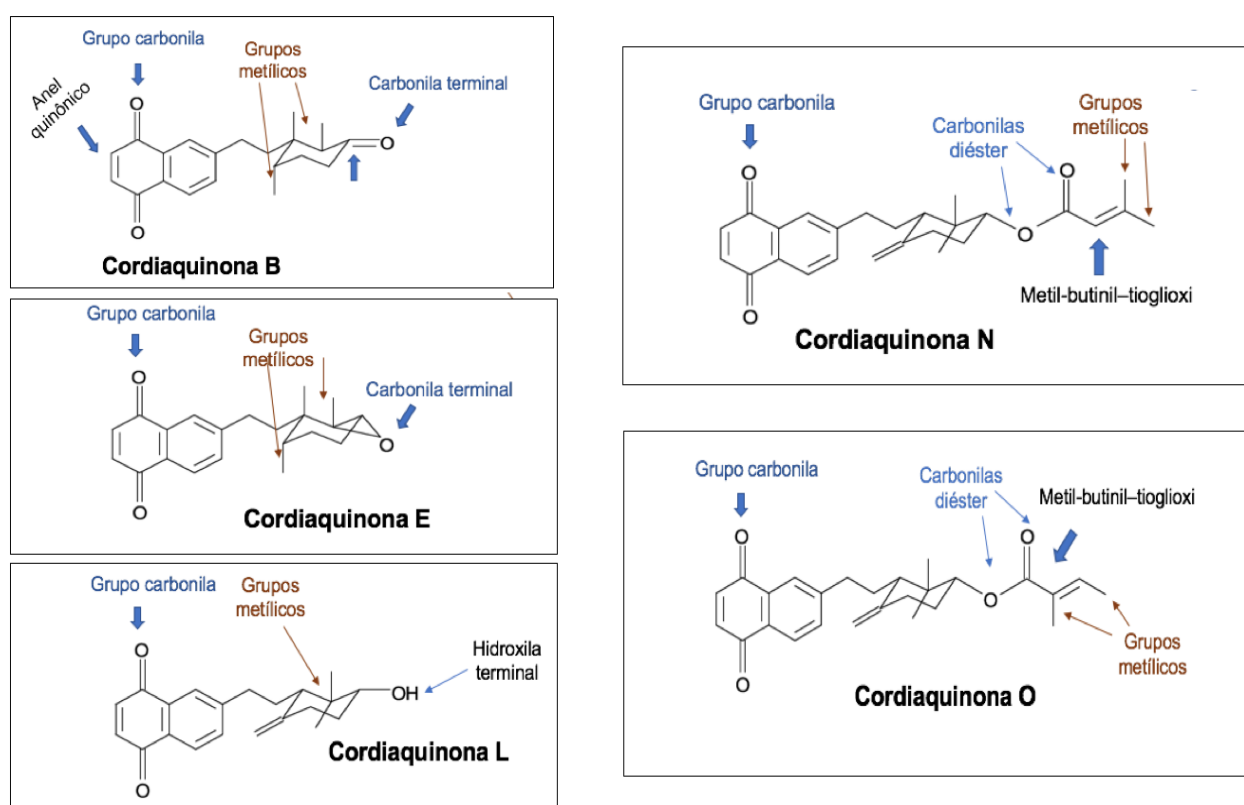
**Tabela 1:** Estudos envolvendo cordiaquinonas descritos na literatura.

| <b>Autor</b>                          | <b>Cordiaquinona</b> | <b>Origem</b>                   | <b>Atividade Biológica</b> |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------|
| <b>BIEBER et al., 1990</b>            | A e B                | <i>Cordia corymbosa</i>         | ----                       |
| <b>DA SILVA FILHO et al., 1993</b>    | A e B                | <i>Cordia corymbosa</i>         | Antifúngica                |
| <b>BIEBER et al., 1994</b>            | C e D                | <i>Cordia corymbosa</i>         | ----                       |
| <b>BIEBER &amp; LEBLANC, 1990</b>     | B                    | <i>Cordia corymbosa</i>         | ----                       |
| <b>KURAMOCHI et al., 1996</b>         | B                    | Sintética                       | ----                       |
| <b>IOSET et al., 1998</b>             | E, F, G e B          | <i>Cordia linnaei</i>           | Antifúngica e larvicida    |
| <b>IOSET et al., 2000</b>             | A, B, J, e K         | <i>Cordia curassavica</i>       | Antifúngica e larvicida    |
| <b>BATALINI &amp; BIEBER, 2001</b>    | A                    | Sintética (modelo experimental) | ----                       |
| <b>YAJIMA et al., 2003</b>            | K                    | Sintética                       | ----                       |
| <b>YAJIMA et al., 2005</b>            | J e K                | Sintética                       | ----                       |
| <b>ARKOUDIS &amp; STRATAKIS, 2008</b> | B, C, J e K          | Sintética                       | ----                       |
| <b>DINIZ et al., 2009</b>             | L e M                | <i>Cordia leucocephala</i>      | ----                       |
| <b>MARINHO-FILHO et al., 2010</b>     | J                    | <i>Cordia leucocephala</i>      | Antitumoral                |
| <b>FREITAS et al., 2012</b>           | B, E, L, N e O       | <i>Cordia polycephala</i>       | Antitumoral                |
| <b>OLIVEIRA et al., 2012</b>          | J, L e M             | <i>Cordia leucocephala</i>      | ----                       |
| <b>DINIZ et al., 2015</b>             | P                    | <i>Cordia leucocephala</i>      | ----                       |

Fonte: AUTORIA PRÓPRIA.

Conforme relatado anteriormente as cordiaquinonas B e E, já foram descritas tanto pela sua atividade antifúngica e larvicida (IOSET et al., 1998), como pela sua atividade antitumoral, a qual também foi demonstrada pelas cordiaquinonas L, N e O, em um estudo de Freitas e colaboradores (2012). A **figura 11** apresenta os componentes estruturais dessas cinco cordiaquinonas, isoladamente, para efeito de comparação entre as suas estruturas e o seu potencial antibacteriano, a ser discutido mais adiante.

**Figura 11:** Cordiaquinonas B, E, L, N e O e seus componentes estruturais.



Fonte: Adaptado de FREITAS (2010).

As atividades biológicas já descritas para as cordiaquinonas, bem como a atividade antibacteriana de outras quinonas e de compostos originados do gênero *Cordia* descritas em outros estudos, levam a crer no potencial antibacteriano das cordiaquinonas. A investigação desse potencial, por meio de diversos testes antibacterianos *in vitro*, constitui o objeto de estudo deste trabalho.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar a atividade antibacteriana das Cordiaquinonas B, E, L, N e O isoladas a partir das raízes da espécie *Cordia polycephala* contra diversas espécies de bactérias, incluindo estirpes resistentes à metilicina.

#### 3.2 Específicos

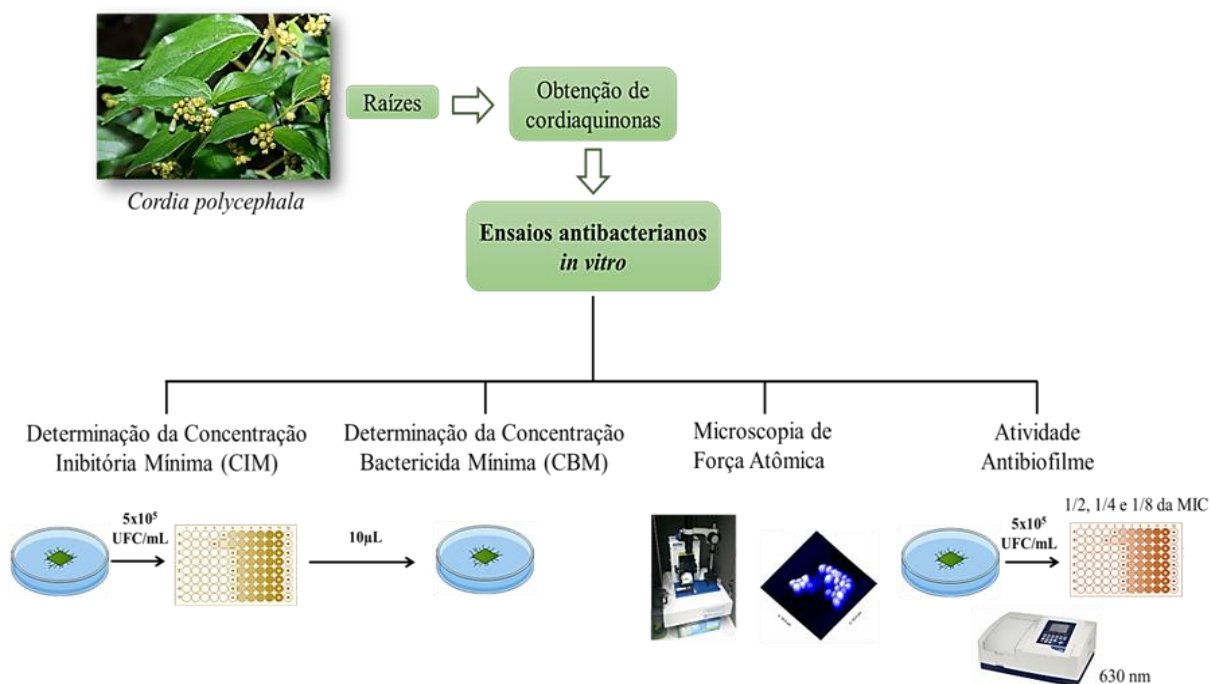
- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima das Cordiaquinonas B, E, L, N e O contra diferentes estirpes bacterianas;
- ✓ Determinar a concentração bactericida mínima (CBM) das Cordiaquinonas B, E, L, N e O contra diferentes estirpes bacterianas;
- ✓ Avaliar o efeito inibitório de Cordiaquinonas sobre a formação de biofilmes;
- ✓ Estudar as alterações morfológicas causadas por cordiaquinonas em células bacterianas, utilizando Microscopia de Força Atômica (MFA).

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

A **figura 12** apresenta o desenho experimental onde está descrito resumidamente todas as etapas deste trabalho. As cordiaquinonas B, E, L, N e O foram obtidas a partir do extrato hexânico das raízes de *Cordia polycephala*, em seguida se deram os ensaios *in vitro* de avaliação da atividade antibacteriana, por meio da determinação das concentrações inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM). Em seguida foi realizada a avaliação da atividade antibiofilme dessas cordiaquinonas e a detecção de alterações morfológicas por microscopia de força atômica.

**Figura 12:** Delineamento experimental.



Descrição esquemática das etapas experimentais deste trabalho.  
Fonte: AUTORIA PRÓPRIA.

### 4.3 Obtenção das cordiaquinonas

As cordiaquinonas B, E, L, N e O foram extraídas a partir do extrato hexânico das raízes da espécie *Cordia polycephala*, isoladas e identificadas por cromatografia, espectrometria de massa e Ressonância Magnética Nuclear no

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), de acordo com Freitas e colaboradores (2010), e gentilmente cedidas pela Professora Dr<sup>a</sup> Otilia Deusdênia Loiola Pessoa para a avaliação do efeito antibacteriano dessas cordiaquinonas.

#### 4.4 Estirpes utilizadas

As estirpes utilizadas para os testes fazem parte do estoque do Campus de Parnaíba da Universidade Federal do Piauí, sendo Gram-negativas: *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 – produtora de ESBL (do inglês *Extended Spectrum Beta-Lactamasis*, Beta-lactamases de Espectro Ampliado) e Gram-positivas: *Staphylococcus epidermidis* ATCC (do inglês: *American Type Culture Collection*) 12228; *Staphylococcus saprophyticus* (Espécime Clínico); *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Staphylococcus aureus* Med 55 (Espécime Clínico Resistente à Meticilina-MRSA); *Staphylococcus epidermidis* 70D (Espécime Clínico Resistente à Meticilina), sendo essas duas últimas cedidas pela professora Dr<sup>a</sup> Maria José dos Santos Soares, do Laboratório de doenças infecciosas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, Campus de Teresina.

#### 4.5 Manutenção das estirpes bacterianas

As bactérias utilizadas são mantidas sob refrigeração a 4 °C, e renovadas periodicamente. Antes da realização dos testes, colônias isoladas da bactéria a ser testada foram inoculadas em caldo Mueller Hinton (Difco™), incubadas por 24 horas a 35±2 °C, em seguida transferidas para uma nova placa de ágar Mueller Hinton e incubadas a 35±2 °C, novamente, por 24 horas antes do teste.

#### 4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

- ✓ Princípio do método:

A CIM pode ser definida como a concentração mais baixa de uma substância na qual nenhum crescimento visível de micro-organismos pode ser detectado. Neste teste, diferentes concentrações de uma mesma substância são diluídas em meio de

cultura contendo um inóculo de micro-organismos em placas de 96 poços. Essa determinação foi realizada por meio de microdiluição das cordiaquinonas em caldo Mueller-Hinton, de acordo com as recomendações da CLSI (do inglês: *Clinical Laboratory Standards Institute*, Instituto de Padrões Clínico Laboratoriais) (2015).

Para determinar se a substância é bactericida (capaz de matar bactérias) ou bacteriostática (capaz de inibir o crescimento bacteriano) foi realizado o teste de CBM. A CBM é definida como a menor concentração de agente antimicrobiano necessária para matar 99,9% do inóculo subcultivado da microdiluição em superfície de placas de ágar não seletivas após 24 horas de incubação. Dessa maneira, se fornecem novas condições de crescimento bacteriano, com abundância de alimento, e baixa quantidade da substância inibidora. Assim, se a substância for bactericida não haverá crescimento na nova placa, e se for bacteriostática, haverá crescimento (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Além disso, para que uma substância seja considerada bactericida, é necessário que seu valor de CBM seja no máximo quatro vezes maior do que o MIC (FRENCH, 2006).

✓ Procedimento experimental:

Inicialmente as bactérias foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton e, em seguida, as mesmas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas numa temperatura de  $35 \pm 2$  °C. Após 24 horas, colônias isoladas foram coletadas com o auxílio de alça bacteriológica descartável e suspensas em solução salina estéril [NaCl 0,85% (p/v)], de modo a obter uma suspensão de bactérias cuja absorvância no comprimento de onda de 625 nm varie entre 0,08 a 0,13 correspondendo a 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL).

Em seguida, esta suspensão foi utilizada para a obtenção do inóculo bacteriano em Caldo Mueller Hinton (Difco™), com concentração final de bactérias de  $5 \times 10^5$  UFC/mL, sendo posteriormente transferido para placas de 96 poços. As bactérias foram então expostas a uma microdiluição seriada de razão dois das cordiaquinonas B, E, L, N e O diluídas no meio de cultura e dimetilsulfóxido (DMSO) 5%. Como controle positivo, foi utilizado o antibiótico Vancomicina (32 a 0,25 µg/mL) para bactérias Gram-positivas e Meropenem (8 a 0,06 µg/mL) para as Gram-negativas, e como controle negativo (controle de crescimento bacteriano), foi utilizado o caldo Mueller-Hinton com DMSO (5%).

Após 24 horas, foi observado se as substâncias foram capazes de inibir o crescimento bacteriano e qual a CIM das mesmas. Para isso, foi utilizado o corante azul de resazurina (0,01%), que possui coloração azul. Quando a célula está viável, a resazurina é reduzida a resorufina, que possui coloração rosa (PESCH; SIMMERT, 1929). Quando não houver mudança de coloração é possível inferir a ausência de crescimento bacteriano. Para a determinação da MBC um volume de 10 µL foi transferido dos poços cuja concentração da substância testada foi igual ou superior à CIM, para uma nova placa de ágar Mueller-Hinton (Difco™), que foi incubada por 24 horas a 35±2 °C, e em seguida, observada a presença ou ausência de crescimento bacteriano.

#### **4.7 Avaliação da atividade antibacteriana por meio da inibição da formação de biofilme**

✓ Princípio do método:

A capacidade de formar biofilmes é um importante fator de virulência de bactérias, e diversos agentes antibacterianos vem sendo testados quanto à sua capacidade de inibir essa formação. Para isso diversas técnicas são utilizadas, uma delas consiste na determinação da Densidade óptica do filme bacteriano marcado com cristal violeta por espectrofotometria (STEPANOVIC et al., 2000).

✓ Procedimento experimental:

Esse ensaio foi realizado em placas de 96 poços, na qual em cada poço foi adicionado a suspensão bacteriana a  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Em seguida, as cordiaquinonas B, E e L em concentrações inferiores à CIM (1/2, 1/4 e 1/8 da CIM) foram adicionadas ao meio TSB (*Tryptical Soya Broth*, Difco™) suplementado com 0,5% de glicose e transferidas para a placa. A placa foi então incubada a 37 °C por 24 horas em condições aeróbicas. Depois desse período, o meio de cultura foi removido e os poços lavados duas vezes com água destilada. Em seguida, o biofilme foi fixado com 100 µL de Metanol (PA) por 15 minutos, corado com cristal violeta a 0,1% (v/v) e lavado com água.

A formação do biofilme foi avaliada pela adição de 100 µL de etanol a 95% aos poços. As placas foram, então, submetidas à espectrofotometria, no comprimento de onda de 630 nm (Touch Bioeasy plate reader). A absorbância de



cada poço foi utilizada para o cálculo do percentual de inibição da formação de biofilmes, e os valores de absorvância foram normalizados com base na média do controle de biofilme (0% de inibição da formação de biofilme) e a média do controle de (100% de inibição da formação de biofilme) (STEPANOVIC et al., 2000).

## 4.8 Estudos de mecanismo de ação

### 4.8.1 Microscopia de Força Atômica

#### ✓ Princípio do método:

A microscopia de força atômica (MFA) é uma técnica de microscopia versátil e particularmente aplicável ao estudo de micro-organismos, uma vez que permite a detecção de pequenas alterações na morfologia dos mesmos, devido à sua capacidade de gerar imagens em escala nanométrica (EATON et al., 2008).

#### ✓ Procedimento experimental

Para avaliar possíveis alterações morfológicas induzidas pela cordiaquinona L nas células bacterianas, ensaio com microscopia de força atômica foi realizado como descrito por Araújo e colaboradores (2015) utilizando microscópio TT-AFM da empresa AFM Workshop (EUA).

Neste ensaio, o protocolo para determinar a CIM foi repetido como descrito anteriormente. Após um período de incubação de 24 horas, 30  $\mu\text{L}$  do meio de cultura contendo o tratamento (Cordiaquinona L, 7,8  $\mu\text{M}$ ) ou bactérias não tratadas foram depositados em uma superfície de vidro limpa, seguida de secagem em incubadora bacteriológica a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 10 minutos.

As amostras, em seguida, foram lavadas de forma suave com água deionizada para remover cristais de sal e outros componentes do meio de crescimento indesejados e secadas novamente nas mesmas condições. Para a realização da análise de MFA, as amostras foram preparadas ao mesmo tempo, expostas às mesmas condições e examinadas dentro de 8 horas após a deposição.

A análise do efeito antimicrobiano das cordiaquinonas foi realizada em modo vibratório, usando cantilevers (NSG10 / NT-MDT) com frequência de ressonância de aproximadamente 240 kHz. As imagens foram analisadas usando o *software Gwyddion* versão 2.40. Múltiplas áreas de cada amostra foram examinadas e

imagens representativas dos grupos de bactérias tratadas e não tratadas foram selecionadas.

#### **4.9 Análise estatística**

Os resultados obtidos no ensaio antibiofilme foram submetidos à análise estatística utilizando o software *GraphPad Prism* 7.01, aplicando-se ANOVA unidirecional e teste de comparação múltipla de Tukey, com  $p < 0,05$  sendo estatisticamente significante. Todas as imagens obtidas pela MFA foram analisadas e, em seguida, medidos o tamanho das células, os dados também foram analisados pelo *GraphPad Prism* 7.01, utilizando o teste T-student para comparação das médias ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Concentração inibitória mínima das cordiaquinonas B, E, L, N e O

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas, conforme previamente descrito, de maneira a avaliar a capacidade das cordiaquinonas testadas de inibir o crescimento bacteriano. A **tabela 2** descreve os resultados de CIM para as cordiaquinonas B, E, L, N e O, e do controle positivo Vancomicina para as estirpes Gram-positivas e Meropenem para as Gram-negativas.

**Tabela 2:** Concentração Inibitória Mínima das cordiaquinonas B, E, L, N e O em diversas estirpes bacterianas.

| Estirpes  | Cordiaquinonas |       |       |        |       | CP   |      |
|---|----------------|-------|-------|--------|-------|------|------|
|   |                | B     | E     | L      | N     | O    | V/Me |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i><br>ATCC 12228 | μM             | 31,25 | 31,25 | 125    | 125   | >500 |      |
|   | μg/mL          | 10,13 | 10,13 | 40,5   | 50,75 | >203 | 1,0  |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i>             | μM             | 62,5  | 31,25 | 7,8    | >500  | >500 |      |
|   | μg/mL          | 20,25 | 10,13 | 2,53   | >203  | >203 | 1,0  |
| <i>Enterococcus faecalis</i><br>ATCC 29212      | μM             | 500   | 500   | >500   | >500  | >500 |      |
|   | μg/mL          | 162   | 162   | >162,3 | >203  | >203 | 4,0  |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 29213      | μM             | 62,5  | 500   | 250    | >500  | >500 |      |
|   | μg/mL          | 20,25 | 162   | 81     | >203  | >203 | 1,0  |
| <i>Staphylococcus aureus</i> Med 55             | μM             | 62,5  | 500   | 125    | >500  | >500 |      |
|   | μg/mL          | 20,25 | 162   | 40,5   | >203  | >203 | 1,0  |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> 70D           | μM             | 31,25 | 125   | 625    | 250   | >500 |      |
|   | μg/mL          | 10,13 | 40,5  | 20,25  | 101,5 | >203 | 2,0  |
| <i>Salmonella choleraesuis</i><br>ATCC 14028    | μM             | >500  | >500  | >500   | >500  | >500 |      |
|   | μg/mL          | >162  | >162  | >162   | >203  | >203 | 0,1  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i><br>ATCC 700603     | μM             | >500  | >500  | >500   | >500  | >500 |      |
|   | μg/mL          | >162  | >162  | >162   | >203  | >203 | 0,1  |

CP – controle positivo; Vancomicina para as estirpes Gram-positivas (V) e Meropenem para as Gram-negativas (Me).

É possível observar que as cordiaquinonas B e E inibiram o crescimento de todas as estirpes Gram-positivas testadas, incluindo *Staphylococcus* resistentes à Meticilina, e *Enterococcus faecalis* com CIM variando da maior concentração testada (162 µg/mL) a 10,13 µg/mL. A cordiaquinona L inibiu o crescimento de todas as estirpes de *Staphylococcus* testadas, incluindo as resistentes à Meticilina, com CIM variando de 81 a 2,53 µg/mL (sendo a última contra o espécime clínico *Staphylococcus saprophyticus*, o CIM mais baixo entre as cordiaquinonas testadas). A Cordiaquinona N foi ativa contra *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* 70D com valores de CIM de 50,75 e 101,5 µg/mL, respectivamente, e a Cordiaquinona O foi inativa contra todas as estirpes nas concentrações testadas, indicando uma atividade relevante das Cordiaquinonas B, E, L e N contra o gênero *Staphylococcus*.

## 5.2 Concentração bactericida mínima das cordiaquinonas B, E, L e N

Para determinar se as cordiaquinonas que foram capazes de inibir o crescimento bacteriano são bactericidas ou bacteriostáticas, a concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada, conforme descrito anteriormente. A **tabela 3** apresenta os resultados de CBM para as cordiaquinonas B, E, L e N. Os resultados da **tabela 3** sugerem que a Cordiaquinona B foi bactericida contra *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* 70D e *E. faecalis* 29212, enquanto bacteriostática contra *S. epidermidis* 12228, *S. aureus* Med 55 e *S. aureus* 29213.

A Cordiaquinona E teve ação bactericida contra *S. epidermidis* 12228, *S. epidermidis* 70D, *S. saprophyticus* e *E. faecalis* 29212, enquanto bacteriostáticos contra *S. aureus* 29213 e *S. aureus* Med 55. Por outro lado, a Cordiaquinona L era bactericida contra *S. epidermidis* 12228, *S. epidermidis* 70D, *S. aureus* Med 55, enquanto bacteriostáticos contra *S. saprophyticus* e *S. aureus* 29213. Cordiaquinona N não apresentou efeito bactericida contra nenhuma espécie testada e é, portanto, considerada bacteriostática contra *S. epidermidis* 12228 e *S. epidermidis* 70D.

**Tabela 3:** Concentração Bactericida Mínima ( $\mu\text{M}$ ) das cordiaquinonas B, E, L, N e O em diversas estirpes bacterianas.

| <b>Cordiaquinonas</b>                 |                  |          |          |          |          |
|---------------------------------------|------------------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Estirpes</b>                       |                  | <b>B</b> | <b>E</b> | <b>L</b> | <b>N</b> |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>     | $\mu\text{M}$    | 500      | 125      | 500      | >500     |
| ATCC 12228                            | $\mu\text{g/mL}$ | 162      | 40,5     | 162      | >203     |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i>   | $\mu\text{M}$    | 62,5     | 62,5     | 125      |          |
| EC                                    | $\mu\text{g/mL}$ | 20,25    | 20,25    | 40,5     | —        |
| <i>Enterococcus faecalis</i>          | $\mu\text{M}$    | 500      | 500      |          |          |
| ATCC 29212                            | $\mu\text{g/mL}$ | 162      | 162      | —        | —        |
| <i>Staphylococcus aureus</i>          | $\mu\text{M}$    | >500     | >500     | >500     |          |
| ATCC 29213                            | $\mu\text{g/mL}$ | >162     | >162     | >162     | —        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> Med 55   | $\mu\text{M}$    | >500     | >500     | 500      |          |
|                                       | $\mu\text{g/mL}$ | >162     | >162     | 162      | —        |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> 70D | $\mu\text{M}$    | 125      | 500      | 250      | >500     |
|                                       | $\mu\text{g/mL}$ | 40,5     | 162      | 81       | >203     |

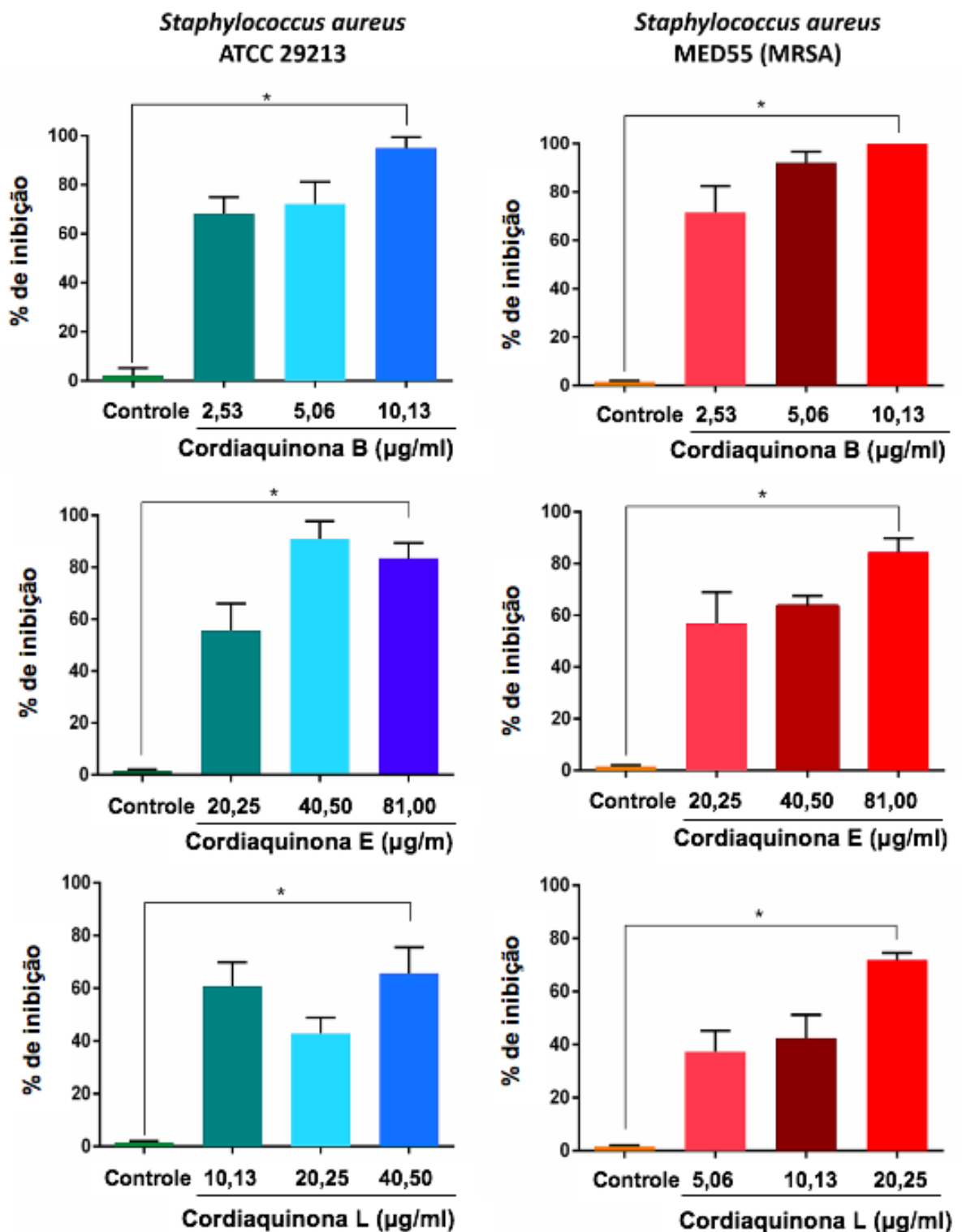
— teste não realizado devido à ausência de inibição do crescimento no teste anterior. EC – espécime clínica.

### 5.3 Inibição da formação de biofilme

Em virtude das cordiaquinonas B, E e L terem inibido o crescimento de estirpes formadoras de biofilme *S. aureus* 29213, *S. aureus* Med 55, foi avaliado se as mesmas tinham o potencial de inibir a formação de biofilme, seguindo a metodologia previamente descrita. Os gráficos da **figura 13** apresentam o percentual de inibição da formação de biofilme das cordiaquinonas B, E, e L.

Essas substâncias foram capazes de inibir a formação de biofilme em concentrações sub-CIM (1/2; 1/4 e 1/8 da CIM). A cordiaquinona B foi capaz de inibir a formação de biofilme de *S. aureus* 29213 em cerca de 95% em 1/2 de CIM, 71,8% em 1/4 de CIM e 68,1% em 1/8 de CIM. Contra o biofilme de *S. aureus* MED 55, a porcentagem média de inibição variou de 71,5 a (1/8 da CIM) a 100% (a 1/2 da CIM).

Figura 13: Inibição da formação de biofilme.



Percentuais de inibição da formação de biofilme: Cordiaquinonas contra *Staphylococcus aureus* 29213 (em azul). Cordiaquinonas contra *Staphylococcus aureus* Med 55 (em vermelho). \* =  $p < 0,05$ .

A cordiaquinona E inibiu a formação de biofilme de *S. aureus* 29213 com a porcentagem média de inibição variando de 55,6% (a 1/8 da CIM) a 91% (com 1/4 da CIM). A porcentagem média de inibição desta mesma substância contra o biofilme de *S. aureus* MED 55 foi de 84,5% em 1/2 de CIM, 63,6% em 1/4 de CIM e 56,8 em 1/8 de MIC. A porcentagem média de inibição da formação de biofilme por cordiaquinona L contra *S. aureus* 29213 variou de 42,8 (com 1/4 de CIM) a 65,7 (com 1/2 de CIM) e de 37,3 (com 1/8 de CIM) a 71,8 (com 1/2 de CIM) contra o biofilme de *S. aureus* MED 55.

Todos esses valores foram estatisticamente diferentes quando comparados ao controle ( $p < 0,05$ ). A cordiaquinona B mostrou o mais forte potencial antibiofilme entre as cordiaquinonas testadas, no entanto, cordiaquinonas E e L também mostraram porcentagem relevante de inibição. Nenhuma diferença estatística foi observada entre diferentes concentrações das cordiaquinonas testadas, embora uma pequena diminuição possa ser observada quando a concentração da substância foi reduzida na porcentagem média de inibição da formação de biofilme de *S. aureus* MED 55 sob o tratamento das três cordiaquinonas testadas, e de *S. aureus* 29213 tratado com cordiaquinona B, como demonstrado na **figura 13**.

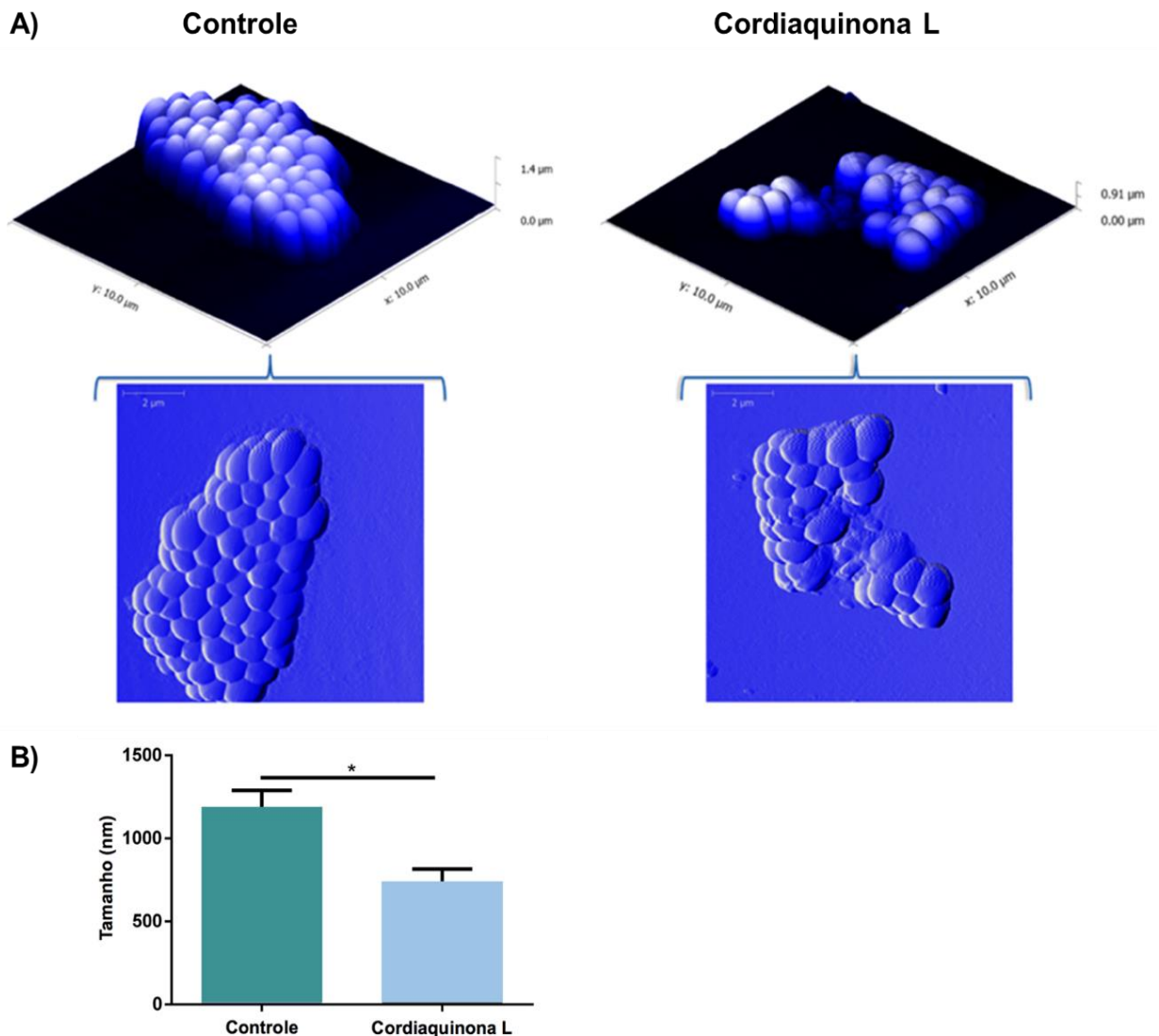
#### 5.4 Alterações morfológicas detectadas por microscopia de força atômica

Para analisar as alterações morfológicas causadas pelas cordiaquinonas nas células bacterianas, o melhor resultado de CIM (7,8  $\mu\text{M}$  da Cordiaquinona L contra *S. saprophyticus*) foi selecionado para a realização de MFA, conforme previamente descrito. Todas as imagens obtidas por MFA foram analisadas e o tamanho das células medido. Em seguida os dados foram analisados pelo programa *GraphPad Prism*, utilizando o teste T-student, onde encontrou-se uma diferença estatística entre os tamanhos das bactérias entre o grupo controle e o grupo submetido ao tratamento com a cordiaquinona L ( $p < 0,05$ ). A **figura 14A** exibe as imagens obtidas para os grupos tratados e controle, onde é possível observar diferenças na morfologia de ambos os grupos. No grupo controle as células apresentam morfologia íntegra, forma arredondada, e formato de colônia semelhante a um cacho de uvas, característico do gênero *Staphylococcus*. O grupo tratado com a cordiaquinona L apresenta células com um formato menos arredondado e mais rugoso, com algumas células aparentemente destruídas. O formato da colônia também se apresenta

alterado, além dessa apresentar um menor tamanho em relação à colônia do grupo controle. Além dessas alterações podemos destacar a diferença entre os tamanhos das células de ambos os grupos.

A **figura 14B** traz o gráfico dos tamanhos médios das células dos grupos tratado e controle, onde é possível observar uma elevada redução de tamanho entre o grupo sem tratamento e tratados com cordiaquinona L. As bactérias do grupo controle têm tamanho médio de 1300 nm, enquanto as bactérias expostas à cordiaquinona L apresentaram uma média de 700 nm, representando uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no tamanho entre os grupos.

**Figura 14:** Efeito da cordiaquinona L ( $7,8 \mu\text{M}$ ) contra *S. saprophyticus*.



(A) Imagens tridimensionais de Microscopia de Força Atômica; (B) Tamanho médio das células bacterianas antes e depois do tratamento com a cordiaquinona L. \* $p < 0,05$ .



## 6 DISCUSSÃO

O elevado número de infecções bacterianas e a resistência a antibióticos motivam a busca por novos agentes para combater essas infecções (ROSSITER; FLETCHER; WUEST, 2017). Nesse contexto, as cordiaquinonas B, E, L, N e O foram avaliadas quanto ao seu potencial antibacteriano. Foi observado que as cordiaquinonas B, E, L e N foram capazes de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, com melhores resultados contra o gênero *Staphylococcus*. Também se observou que essas cordiaquinonas foram capazes de inibir o crescimento de bactérias sensíveis e resistentes à Metilina.

Outras naftoquinonas, como a plumbagina, a juglona, e o lapachol, são conhecidas por sua atividade antibacteriana (WANG et al., 2016). Yang e Lee (2015) também avaliaram a atividade antibacteriana de várias naftoquinonas obtidas de *Lawsonia inermis* e encontraram considerável inibição do crescimento bacteriano, por outro método de avaliação (difusão em ágar). Lee e colaboradores (2015) também encontraram atividade antibacteriana da naftoquinona shikonina contra *S. aureus* tanto sensível quanto resistente à Metilina (CIM variou entre 7,8 e 31,2 µg/mL), corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Estudos recentes com outras classes de quinonas, como antraquinonas e benzoquinonas, também encontraram atividade antibacteriana. Farooq e colaboradores (2017) isolaram três novas antraquinonas (simploquinonas A-C) e encontraram atividade contra o *Streptococcus mutans*, MRSA (bactérias Gram-positivas) e *Proteus mirabilis* (bactérias Gram-negativas), com CIM variando de 83 a 160 µg/mL. Ooi e colaboradores (2016) encontraram boa atividade do composto terc-butil benzoquinona (TBBQ) frente a isolados clínicos de *S. aureus* (CIM 8 µg/mL), resultados que evidenciam o potencial antibacteriano das quinonas, e justificam o interesse em estudá-las.

Embora as cordiaquinonas testadas nesse trabalho não tenham inibido o crescimento das estirpes Gram-negativas testadas, esse resultado corrobora com os de Souza e colaboradores (2013) que encontraram atividade antibacteriana do lapachol e seus derivados apenas contra estirpes Gram-positivas (CIM de 0,25 µg/mL), bem como corrobora com os de Moreira e colaboradores (2017), que testaram a atividade antibacteriana de 36 naftoquinonas, sendo as mesmas predominantemente ativas contra estirpes Gram-positivas (CIMs variaram entre 32 e

256 µg/mL) e inativas contra Gram-negativas. Novais e colaboradores (2018), entretanto, promoveram mudanças em algumas naftoquinonas conhecidas, e obtiveram resultados contrastantes, com predomínio de atividade contra estirpes Gram-negativas (CIM variando entre 4 e 256 µg/mL).

Este fato pode ser explicado pela diferença nas estruturas da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, uma vez que a membrana externa dos lipopolissacarídeos presentes nas Gram-negativas confere uma camada extra de proteção contra agentes antibacterianos reduzindo a sua permeabilidade a agentes antibacterianos e tornando as infecções mais difíceis de serem tratadas (MASI et al., 2017).

O fato de uma substância inibir apenas o crescimento de uma classe de bactérias pode contribuir para sua especificidade, uma vez que seu espectro é reduzido. Além de serem seletivos contra estirpes Gram-positivas, as cordiaquinonas testadas mostraram uma atividade mais forte contra o gênero *Staphylococcus*, conhecido por sua capacidade de causar uma ampla gama de doenças (VAN HORN et al., 2014), sugerindo que essas substâncias poderiam ser úteis no tratamento dessas infecções.

A literatura também relata que algumas naftoquinonas podem ser bacteriostáticas, enquanto outras são bactericidas. Riffel e colaboradores (2002) testaram a atividade antibacteriana de várias naftoquinonas e todas mostraram efeito bacteriostático (CIMs entre 30 e 500 µg/mL ou mais altas), enquanto Fischer e colaboradores (2012) encontraram atividade bactericida da juglona (CBM de 1,75 µg/mL). Os resultados mostrados neste estudo sugerem que as cordiaquinonas testadas não exercem a ação antibacteriana para todas as espécies, e o efeito contra a mesma estirpe também podem variar quando tratadas com diferentes cordiaquinonas. Esses resultados reforçam a ideia de um mecanismo de ação não-fixo das naftoquinonas, e que, seu efeito depende da sensibilidade da espécie aos agentes antibacterianos, da estrutura da substância e de como ela interage com as moléculas do micro-organismo alvo.

As cordiaquinonas B, E e L foram capazes de inibir a formação de biofilme de *S. aureus* 29213 e *S. aureus* Med 55, sem diferença estatística entre a porcentagem de inibição da formação de biofilme entre as diferentes concentrações testadas de cada substância. Este resultado também reforça seu potencial antibacteriano, dada a dificuldade de tratar infecções bacterianas na presença de biofilme. Moreira e

colaboradores (2017) também encontraram entre suas naftoquinonas estudadas um composto capaz de inibir a formação de biofilme por uma cepa de MRSA (BMB9393), com uma porcentagem de inibição de cerca de  $34 \pm 2,4\%$ . Novais e colaboradores (2018) também encontraram 3 naftoquinonas capazes de inibir a formação de biofilme da estirpe Gram-negativa *P. aeruginosa* ATCC 15442 em cerca de 65%, corroborando com o potencial antibiofilme das naftoquinonas e os resultados deste estudo.

Outras quinonas de diferentes classes, como as Simploquinonas A e C também foram capazes de inibir a formação de biofilme de *S. mutans*, *S. aureus* e *P. mirabilis* (percentual de inibição variou entre 18 e 92%) (FAROOQ et al., 2017). Além disso, a TBBQ também erradicou o biofilme já formado por *S. aureus*, sugerindo que por causar danos em sua membrana celular, a promoção da morte da bactéria, independentemente do estágio de crescimento do biofilme, era o mecanismo de ação dessa quinona (OOI et al., 2016).

Por meio da MFA foi possível observar diferenças morfológicas entre as células de *S. saprophyticus* tratadas e não tratadas com a cordiaquinona L, onde uma considerável redução no tamanho das células tratadas quando comparadas com as células controle foi observada. Outros autores também analisaram o efeito antibacteriano de produtos naturais em bactérias do gênero *Staphylococcus* utilizando MFA (ANDERSON et al., 2004; ALHARBI et al., 2016;) embora as imagens de MFA deste trabalho sejam as primeiras relatadas para a espécie *Staphylococcus saprophyticus*.

Almeida e colaboradores (2019) não encontraram diferenças aparentes na superfície das células tratadas com uma fração rica em flavonoides de *Maclura tinctoria* e o grupo controle, no entanto, assim como neste trabalho foram observadas alterações na morfologia da colônia de bactérias. Campos e colaboradores (2012) também observaram uma redução no tamanho celular de *Staphylococcus*, com aparente colapso de algumas células, aumento da rugosidade e presença de detritos celulares, resultados esses que corroboram com os encontrados neste trabalho (**figura 14**).

Araujo e colaboradores (2015) observaram um aumento no tamanho celular de *S. aureus* quando tratados com a fração aquosa de um extrato etanólico de *Terminalia fagifolia*, resultado semelhante ao de Quelemes e colaboradores (2016) que avaliou o efeito antibacteriano de goma do cajueiro modificada por

quaternização. Campos (2017) também observou um aumento nas dimensões de células de *S. aureus* tratadas com extrato etanólico de própolis em relação às células não tratadas. Esse resultado difere do obtido neste trabalho, no qual foi observada uma diminuição no tamanho médio das células.

Esses resultados podem ser explicados devido a diferentes mecanismos de ação antibacteriana. Os compostos testados pelos autores acima podem ter afetado a integridade da membrana celular, causando lise (CAMPOS, 2017), ou levando a alterações na osmolaridade, entrada de fluido nas células e consequente aumento no tamanho das mesmas (ARAUJO et al., 2015; QUELEMES et al., 2016). Neste estudo foram observadas alterações na superfície, que podem estar relacionadas à dano na membrana celular (ANDERSON et al., 2004), no entanto a redução do tamanho neste estudo não é compatível com a entrada de líquido na células, mas pode estar relacionada com o extravasamento do conteúdo celular (CAMPOS et al., 2012).

A estrutura de uma substância está intimamente relacionada à sua capacidade de interagir com estruturas celulares e exibir atividade biológica (ZHAO et al., 2015). As cordiaquinonas B, E, L, N e O, alvos deste estudo, mostraram diferenças em sua atividade, que podem estar diretamente relacionadas às suas diferenças estruturais. Zhao e colaboradores (2015), ao estudarem a atividade antibacteriana dos análogos da indoloquinolina, sugeriram que o número, tipo de anel, posição e tipo de grupos funcionais presentes, carbonila (C=O) e hidroxila (-OH) na estrutura analógica, são capazes de afetar sua atividade.

A presença de grupos carbonila nas cordiaquinonas B e E em sua porção terminal pode estar relacionada à sua atividade antibacteriana, bem como ao grupo hidroxila terminal na Cordiaquinona L. Essa diferença nos grupos funcionais é uma possível razão, por exemplo, do porquê as cordiaquinonas B e E foram bactericidas contra *S. saprophyticus* enquanto a Cordiaquinona L foi bacteriostática, no entanto, outros experimentos, tais como a docagem molecular, devem ser realizados para comprovar tal sugestão.

Bhattacharya e colaboradores (2013) estudaram o mecanismo de ação da plumbagina contra *Bacillus subtilis*, e observaram que ela impede a divisão de células bacterianas por inibir a formação do anel Z, que é crucial para a citocinese bacteriana (SINGH; PANDA, 2010). Outras quinonas podem também prevenir a divisão celular por ligação a topoisomerasas bacterianas. Duan e colaboradores

(2014) observaram que a emodina de aloe exibiu forte atividade contra a topoisomerase I e a DNA girase bacteriana, mas não teve efeito contra as topoisomerases humanas.

Outro mecanismo pelo qual as quinonas podem exercer sua ação é a geração de EROs. As quinonas têm o potencial de doar elétrons, o que está relacionado à produção de EROs, levando a efeitos citotóxicos (MADEO; ZUBAIR; MARIANNE, 2013). De fato, o mecanismo de toxicidade celular da cordiaquinona J, cuja estrutura é semelhante àquela das cordiaquinonas B, E e L, é a geração de estresse oxidativo e a morte celular posterior (MARINHO-FILHO et al., 2010; 2012). Wang e colaboradores (2016), ao avaliar diferenças na expressão de proteínas de *S. aureus* entre antes e depois do tratamento com juglona, observaram que o tratamento aumentava a expressão de oxidoreductases e criava um ambiente peroxidativo dentro da célula, levando à diminuição da formação da parede celular e ao aumento da permeabilidade da membrana.

Por outro lado, algumas quinonas como a lawsona e derivados foram descritos por sua atividade antioxidante (DE OLIVEIRA et al., 2017), efeito paradoxal à geração de EROs. Bolton e Dunlap (2017) revisaram os efeitos citotóxicos e citoprotetores contrastantes das quinonas e sugeriram que a variação na sua eletrofilicidade e no seu potencial de redução, bem como sua taxa e origem podem influenciar na reatividade das quinonas, seus alvos biológicos, como proteínas e DNA, ou glutathiona reduzida e seu efeito intracelular.

O efeito citotóxico de uma substância pode afetar seu uso potencial como tratamento de uma doença, uma vez que também pode afetar células saudáveis. Freitas e colaboradores (2012) também avaliaram a atividade hemolítica das cordiaquinonas B, E, L, N e O e não detectaram hemólise em nenhuma concentração testada nesta avaliação antibacteriana (a concentração máxima foi de 500  $\mu$ M). Uma grande quantidade de fármacos é administrada por via endovenosa, ou por via oral, e em algum momento atingindo a corrente sanguínea, tornando importante avaliar a capacidade de um fármaco em causar danos aos eritrócitos. Além disso, a ausência de atividade hemolítica na maior concentração testada sugere que os efeitos citotóxicos descritos não estão relacionados a danos inespecíficos à membrana.

Enquanto isso, Marinho-Filho e colaboradores (2010), encontraram o efeito citotóxico da Cordiaquinona J contra linfócitos normais. No entanto, este fato não

implica que essas cordiaquinonas também sejam citotóxicas para essas células, uma vez que os resultados de CIM e CBM desse estudo sugere que as cordiaquinonas não apresentam um padrão de toxicidade, e dependem da interação com os componentes das células, pois cordiaquinonas distintas não apresentaram o mesmo efeito contra a mesma estirpe, bem como a mesma cordiaquinona apresentou efeito variável contra diferentes estirpes.

Caso sejam comprovados seus efeitos citotóxicos, outras alternativas de uso dessas cordiaquinonas podem ser avaliadas, como um medicamento tópico para tratar infecções de pele (DEL ROSSO, 2016; OOI et al., 2016), um tipo muito comum de doença causada por *Staphylococcus* sp. e, devido às suas propriedades de formação de antibiofilme, as cordiaquinonas também poderiam ser usados em superfícies, tais como cateteres médicos (RAAD et al., 1995; NAIR et al., 2016) ou fios ortodônticos (DASTJERDI et al., 2014) para prevenir agregação bacteriana e desenvolvimento de biofilme.

A toxicidade de uma substância também está relacionada com a dose administrada. Algumas estratégias podem ser aplicadas para a redução da dose necessária para que essas substâncias apresentem atividade antibacteriana, tais como a combinação com outras drogas, para obtenção de um efeito sinérgico (MATIAS et al., 2016; OH et al., 2018) bem como a nanoencapsulação com compostos iônicos, ou poliméricos (KHEZERLOU et al., 2018), sugerindo mais opções para a utilização das cordiaquinonas B, E, e L, tendo em vista o seu potencial antibacteriano, demonstrado pelos testes realizados neste trabalho.

## 7 CONCLUSÃO

Diante desses resultados, sugere-se que as cordiaquinonas B, E e L possuem um potencial antibacteriano, devido à sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano tanto de estirpes sensíveis como resistentes à metilicina, bem como a habilidade dessas mesmas substâncias de inibir a formação de biofilmes, fatores que dificultam o tratamento de infecções bacterianas. No entanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar o mecanismo de ação antibacteriana, toxicidade e outras estratégias de uso dessas naftoquinonas como um possível medicamento antibacteriano.

## REFERÊNCIAS

- ABISADO, R. G. *et al.* Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. **mBio**, v. 9, n. 3, p. e02331-17, 2018.
- ABREU, A. C.; MCBAIN, A. J.; SIMOES, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural product reports**, v. 29, n. 9, p. 1007-1021, 2012.
- AGARWAL, A.; SINGH, K. P.; JAIN, A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 147-160, 2010.
- AHMAD, M.; WAJID, M. Plants as potential source of antimicrobial agents. **Journal of Pharmacy and Alternative Medicine**, v. 2, n. 3, p. 18-25, 2013.
- AKHTAR, A. H.; AHMAD, K. U. Anti-ulcerogenic evaluation of the methanolic extracts of some indigenous medicinal plants of Pakistan in aspirin-ulcerated rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 46, n. 1, p. 1-6, 1995.
- ALHARBI, Naiyf S. *et al.* Effects of Piper cubeba L. essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an AFM and TEM study. **Journal of Molecular Recognition**, v. 30, n. 1, p. e2564, 2017.
- ALMEIDA, A. C. *et al.* Prenylated flavonoid-enriched fraction from *Maclura tinctoria* shows biological activity against *Staphylococcus aureus* and protects *Galleria mellonella* larvae from bacterial infection. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 19, n. 1, p. 189, 2019.
- AL-MUSAYEIB, N. *et al.* Antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Cordia sinensis*. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10214-10226, 2011.
- ANDERSON, Rachel Claire; HAVERKAMP, Richard G.; YU, Pak-Lam. Investigation of morphological changes to *Staphylococcus aureus* induced by ovine-derived antimicrobial peptides using TEM and AFM. **FEMS microbiology letters**, v. 240, n. 1, p. 105-110, 2004.
- ANVISA. **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde no 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015**. Brasília: ANVISA, 2016.
- ARKOUDIS, E.; STRATAKIS, M. Synthesis of cordiaquinones B, C, J, and K on the basis of a bioinspired approach and the revision of the relative stereochemistry of cordiaquinone C. **The Journal of organic chemistry**, v. 73, n. 12, p. 4484-4490, 2008.
- ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 5, n. 5, p. 449-467, 2005.



BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

BATALINI, C.; BIEBER, L. W. Model studies on the synthesis of the natural meroterpenoid cordiaquinone A. **Eclética Química**, v. 26, p. 69-76, 2001.

BAYEUX, M. C. *et al.* Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 10, p. 1229-1232, 2002.

BBOSA, G. S. *et al.* Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. **Health**, v. 6, n. 05, p. 410-425, 2014.

BHATTACHARYA, A. *et al.* Plumbagin inhibits cytokinesis in *Bacillus subtilis* by inhibiting F ts Z assembly—a mechanistic study of its antibacterial activity. **The FEBS journal**, v. 280, n. 18, p. 4585-4599, 2013.

BIEBER, L. W. *et al.* Meroterpenoid naphthoquinones from *Cordia corymbosa*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1955-1959, 1990.

BIEBER, L. W.; KREBS, H. C.; SCHÄFER, W. Further meroterpenoid naphthoquinones from *Cordia corymbosa*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 4, p. 1027-1028, 1994.

BIEBER, L. W.; LEBLANC, M. Room-Temperature Structure of Cordiaquinone B. **Acta Crystallographica**, v. 46, p. 911-913, 1990.

BOCÉ, M. *et al.* Effect of trans (NO, OH)-[RuFT (Cl)(OH) NO](PF 6) ruthenium nitrosyl complex on methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 4867, 2019.

BOLTON, J. L.; DUNLAP, T. Formation and biological targets of quinones: cytotoxic versus cytoprotective effects. **Chemical research in toxicology**, v. 30, n. 1, p. 13-37, 2016.

BOWER, S.; ROSENTHAL, K. S. The bacterial cell wall: the armor, artillery, and achilles heel. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 14, n. 5, p. 309-317, 2006.

BROWN, D. G.; LISTER, T.; MAY-DRACKA, T. L. New natural products as new leads for antibacterial drug discovery. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 2, p. 413-418, 2014.

CAMPOS, M. A. *et al.* Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infection and immunity**, v. 72, n. 12, p. 7107-7114, 2004.

CAMPOS, Débora A. et al. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate polymers**, v. 90, n. 1, p. 270-274, 2012.

CAMPOS, J.V. **Avaliação da atividade antimicrobiana e análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM) da ação de extratos de própolis verde sobre Staphylococcus aureus e Escherichia coli**. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of applied bacteriology**, v. 75, n. 6, p. 499-511, 1993.

CASEY A.L.; LAMBERT, P.A.; ELLIOT, T.S.J. Staphylococci. *In* **Journal of Antimicrobial Agents**, 29:S23–32, 2007.

CAVAILLON, J.-M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. **Toxicon**, v. 149, p. 45-53, 2017.

CDC. Centers for Disease Control. **Antibiotic Resistance Threats in the United States**. Atlanta, EUA: CDC, 2013.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**: Approved standard M02–A10. Wayne, Pa: CLSI, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CROSBY, I. T. *et al.* Antiviral agents 2. Synthesis of trimeric naphthoquinone analogues of conocurvone and their antiviral evaluation against HIV. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 6442-6450, 2010.

DA SILVA FILHO, A. A. et al. Biological activity of cordiaquinones A and B, isolated from *Cordia corymbosa*. **Fitoterapia-Milano**, v. 64, p. 78-78, 1993.

DE ARAUJO, A. R. *et al.* Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 14, n. 1, p. 25, 2015.

DEL FIOL, F. S. *et al.* Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n.1, p. 68-72, 2010.

DEL ROSSO, J. Q. Topical and oral antibiotics for acne vulgaris. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 35, n. 2, p. 57-61, 2016.

DE LUCAS, N. C.; FERREIRA, A. B. B; NETTO-FERREIRA, J. C. Fotoquímica de Naftoquinonas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 403-463, 2014.

- DE OLIVEIRA, A. S. *et al.* Antioxidant and Antifungal Activity of Naphthoquinones Dimeric Derived from Lawsone. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 5, n. 2, p. 39-48, 2017.
- DEY, D.; RAY, R; HAZRA, B. Antitubercular and Antibacterial Activity of Quinonoid Natural Products Against Multi-Drug Resistant Clinical Isolates. **Phytotherapy research**, v. 28, n. 7, p. 1014-1021, 2014.
- DINIZ, J. C. *et al.* <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments for two new cordiaquinones from roots of *Cordia leucocephala*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 190-193, 2009.
- DINIZ, J. C. *et al.* An Uncommon Naphthaquinoid and a New Lignan Derivative from the Roots of *Cordia leucocephala* Moric. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 2, p. 325-330, 2015.
- DASTJERDI, E. V. *et al.* Effect of *Punica granatum* L. flower water extract on five common oral bacteria and bacterial biofilm formation on orthodontic wire. **Iranian journal of public health**, v. 43, n. 12, p. 1688-1694, 2014.
- DOS SANTOS, F. N. *et al.* *Montrichardia linifera* (Araceae) biological potential, phytochemical prospection and polyphenol content. **Universitas Scientiarum**, v. 19, n. 3, p. 213-224, 2014.
- DUAN, F. *et al.* Haloemodin as novel antibacterial agent inhibiting DNA gyrase and bacterial topoisomerase I. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3707-3714, 2014.
- DURAND, G. A.; RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: History, methods and perspectives. **International journal of antimicrobial agents**, 2018.
- EATON, P. *et al.* Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Ultramicroscopy**, v. 108, n. 10, p. 1128-1134, 2008.
- EHMANN, D. E.; LAHIRI, S. D. Novel compounds targeting bacterial DNA topoisomerase/ DNA gyrase. **Current opinion in pharmacology**, v. 18, p. 76-83, 2014.
- FAROOQ, U. *et al.* Three new anthraquinone derivatives isolated from *Symplocos racemosa* and their antibiofilm activity. **Chinese journal of natural medicines**, v. 15, n. 12, p. 944-949, 2017.
- FDA. **Drug trials snapshots**. 2019. Disponível em <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drug-trials-snapshots>. Acesso em 10 maio 2019.
- FERNANDES, P.; MARTENS, E. Antibiotics in late clinical development. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 152-163, 2017.

- FISCHER, T. C. *et al.* Potent and specific bactericidal effect of juglone (5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone) on the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 49, p. 12074-12081, 2012.
- FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, n. 3, p. 226-236, 1929.
- FLORES-DÍAZ, M. *et al.* Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 80, n. 3, p. 597-628, 2016.
- FOSTER, T. J. Immune evasion by *staphylococci*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 948–958, 2005.
- FRAZEE, B. W. *et al.* Fatal community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in an immunocompetent young adult. **Annals of emergency medicine**, v. 46, n. 5, p. 401-404, 2005.
- FREITAS, H. P. S. **Estudo químico e farmacológico de *Cordia polycephala* (Lam.) I. N. Johnston (Boraginaceae)**. 2010. 167f. Dissertação (Mestrado em Química com Área de Concentração em Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- FREITAS, H. P. S. *et al.* Cytotoxic cordiaquinones from the roots of *Cordia polycephala*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 8, p. 1558-1562, 2012.
- FRENCH, G. L. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections-the potential role of daptomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 1107-1117, 2006.
- FU, Y. *et al.* Cytotoxic and antibacterial quinone sesquiterpenes from a *Myrothecium fungus*. **Journal of natural products**, v. 77, n. 8, p. 1791-1799, 2014.
- FURUYA, E. Y.; LOWY, F. D. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 36-45, 2006.
- GARNIER, T. *et al.* *In vivo* studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p. 802-810, 2007.
- GILL, S.R. *et al.* Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2426–2438, 2005.
- GOTLAND, N. *et al.* Long-term mortality and causes of death associated with *Staphylococcus aureus* bacteremia. A matched cohort study. **Journal of Infection**, v. 73, n. 4, p. 346-357, 2016.

HAIKO, J.; WESTERLUND-WIKSTRÖM, B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. **Biology**, v. 2, n. 4, p. 1242-1267, 2013.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infection and immunity**, v. 62, n. 3, p. 915-921, 1994.

HAY, R. J.; MORRIS-JONES, R. Bacterial infections. **Rook's Textbook of Dermatology, Ninth Edition**, p. 1-100, 2016.

HOLST, O. *et al.* Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 83-104, 1996.

IOSET, J-R. *et al.* Antifungal and larvicidal meroterpenoid naphthoquinones and a naphthoxirene from the roots of *Cordia linnael*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 729-734, 1998.

IOSET, J-R. *et al.* Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 5, p. 613-617, 2000.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, *Staphylococcus cassette chromosome mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1549-1555, 2000.

KADIOGLU, A. *et al.* The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 288-301, 2008.

KANG, J.; DIETZ, M. J.; LI, B. Antimicrobial peptide LL-37 is bactericidal against *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS one**, v. 14, n. 6, p. e0216676, 2019.

KAVANAUGH, J. S. *et al.* Identification of Extracellular DNA-Binding Proteins in the Biofilm Matrix. **mBio**, v. 10, n. 3, p. e01137-19, 2019.

KEYES, K.; LEE, M. D.; MAURER, J. J. Antibiotics: mode of action, mechanisms of resistance, and transfer. *In*: Torrence, M.E.; Isaacson, R. E. (org.). **Microbial Food Safety in Animal Agriculture**. Iowa: Iowa State Press, 2008, p. 45-56.

KHEZERLOU, A. *et al.* Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 505-526, 2018.

KLINE, K. A. *et al.* Bacterial adhesins in host-microbe interactions. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 6, p. 580-592, 2009.

KURAMOCHI, T. *et al.* Total synthesis of (-)-cordiaquinone B. **Tetrahedron letters**, v. 37, n. 39, p. 7075-7078, 1996.

LACY, M.D. *et al.* Atovaquone/proguanil therapy for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in Indonesians who lack clinical immunity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 9, p. 92-95, 2002.

LEE, H.Z. *et al.* Aloe- emodin induced DNA damage through generation of reactive oxygen species in human lung carcinoma cells. **Cancer Letters**, v. 239, n. 1, p. 55-63, 2006.

LEE, Y-S. *et al.* The mechanism underlying the antibacterial activity of Shikonin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-9, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/520578>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/520578/abs/>. Acesso em: 20 junho 2018.

LEE, J-H. *et al.* Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus*. **Scientific reports**, v. 6, n. 19267, p. 1-11, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep19267>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep19267>. Acesso em: 21 julho 2018.

LEITE, K. G. **Abordagem taxonômica da família Boraginacea Juss.** na Ilha Grande, Angra dos Reis – RJ. 2006. 21f. Projeto de Pesquisa (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Angra dos Reis, 2006.

LEUNG, J. W. *et al.* Is there a synergistic effect between mixed bacterial infection in biofilm formation on biliary stents? **Gastrointestinal endoscopy**, v. 48, n. 3, p. 250-257, 1998.

LOS, F. C.O. *et al.* Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 2, p. 173-207, 2013.

LU, J-J. *et al.* Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 456-463, 2013.

LU, L. *et al.* Developing natural products as potential anti-biofilm agents. **Chinese medicine**, v. 14, n. 1, p. 11, 2019.

MADEO, J.; ZUBAIR, A.; MARIANNE, F. A review on the role of quinones in renal disorders. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 139, 2013.

MASI, M.; RÉFREGIERS, M.; POS, K.M. PAGÈS, J. Mechanisms of envelope permeability and antibiotic influx and efflux in Gram-negative bacteria. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 17001, p. 1-7, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.1>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol20171>. Acesso em: 17 dezembro 2018.

MALDONADO, R. F.; SÁ-CORREIA, I.; VALVANO, M. A. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. **FEMS microbiology reviews**, v. 40, n. 4, p. 480-493, 2016.

MATIAS, E. F. F *et al.* The genus *Cordia*: botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 5, p. 542-552, 2015.

MATIAS, E. F.F *et al.* Potentiation of antibiotic activity of aminoglycosides by natural products from *Cordia verbenacea* DC. **Microbial pathogenesis**, v. 95, p. 111-116, 2016.

MARINHO-FILHO, J. D. B. *et al.* Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. **Chemico-biological interactions**, v. 183, n. 3, p. 369-379, 2010.

MARINHO-FILHO, J. D. B. **Participação das vias atm/atr e c-myc/gsh nos efeitos antitumorais da cordiaquinona J induzidos pelo estresse oxidativos**. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MECCIA, Gina *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* from the Venezuelan Andes. **Natural product communications**, v. 4, n. 8, p. 1119-1121, 2009.

MELLO, C.P.P. *et al.* Aminomethylnaphthoquinones and HSV-1: in vitro and *in silico* evaluations of potential antivirals. **Antiviral Therapy**, v. 21, p. 507-515, 2016.

MIRAGAIA, M. Factors contributing to the evolution of *mecA*-mediated  $\beta$ -lactam resistance in staphylococci: update and new insights from whole genome sequencing (WGS). **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2723, p. 1-16, 2018.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02723>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02723/full>. Acesso em: 15 Fevereiro 2019.

MIRANDA, J.A.L. *et al.* Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 4, p. 1142-1149, 2015.

MOREIRA, C. S. *et al.* Searching for a potential antibacterial lead structure against bacterial biofilms among new naphthoquinone compounds. **Journal of applied microbiology**, v. 122, n. 3, p. 651-662, 2017.

MOSQUERA, M. *et al.* Pediatric case of fatal necrotizing pneumonia due to Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica**, v. 37, n. 1, p. 63, 2019.

NAIR, S. V. *et al.* Antimicrobial activity of plumbagin, a naturally occurring naphthoquinone from *Plumbago rosea*, against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 4, p. 237-248, 2016.

NARAYAN, G.R. *et al.* Antibacterial activities of ethanolic extracts of plants used in folk medicine. **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**, v. 1, n. 2, p. 529-535, 2010.

NARIYA, P. B. *et al.* Antimicrobial and antifungal activities of *Cordia dichotoma* (Forster F.) bark extracts. **Ayu**, v. 32, n. 4, p. 585- 589, 2011.

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2589-2599, 2008.

NOVAIS, J. S. *et al.* Antibacterial naphthoquinone derivatives targeting resistant strain Gram-negative bacteria in biofilms. **Microbial pathogenesis**, v. 118, p. 105-114, 2018.

OH, E. *et al.* Antioxidant-based synergistic eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms with bacitracin. **International journal of antimicrobial agents**, v. 52, n. 1, p. 96-99, 2018.

OLIVEIRA, F. M. *et al.* Quantificação por CLAE de naftoquinonas do extrato das raízes de *Cordia leucocephala* Moric. **HOLOS**, v. 28, n.1, p. 41-48, 2012.

OOI, N. *et al.* Tert-butyl benzoquinone: mechanism of biofilm eradication and potential for use as a topical antibiofilm agent. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 7, p. 1841-1844, 2016.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiol Spectrum** v.6, n. 4, p. 1-17, 2018.

OZA, M. J.; KULKARNI, Y. A. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the medicinal species of the genus *Cordia* (Boraginaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 755-789, 2017.

PAN, L., HEE-BYUNG, C., KINGHORN, A.D. Discovery of new anticancer agents from higher plants. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, v. 4, p. 142–156, 2013.

PANIGRAHI, G. K. *et al.* Interaction of anthraquinones of *Cassia occidentalis* seeds with DNA and Glutathione. **Toxicology reports**, v. 5, p. 164-172, 2018.

PANGHAL, M. *et al.* In vitro antimicrobial activity of ten medicinal plants against clinical isolates of oral cancer cases. **Annals of clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 21, p. 1-11, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-21>. Disponível em: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/10/1/21>. Acesso em: 3 setembro 2018.

PEARSON, P. A. *et al.* Atovaquone for the treatment of toxoplasma retinochoroiditis in immunocompetent patients. **Ophthalmology**. v. 106, n. 1, p. 148-153, 1999.

PESCH, K. L.; SIMMERT, U. Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin Milchw. **Forsch**, v. 8, p. 551, 1929.



PINHOL, L.D. *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, 326–331, 2012.

PLÁCIDO, A. *et al.* Antibacterial activity of novel peptide derived from Cry1Ab16 toxin and development of LbL films for foodborne pathogens control. **Materials Science and Engineering: C**, v. 75, p. 503-509, 2017.

PROFT, T.; BAKER, E. N. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria-structure, assembly and their role in disease. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 4, p. 613-635, 2009.

PUAH, S.; CHUA, K.; TAN, J. Virulence factors and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates in ready-to-eat foods: detection of *S. aureus* contamination and a high prevalence of virulence genes. **International journal of environmental research and public health**, v. 13, n. 2, p. 199, 2016.

QUELEMES, P. V. *et al.* Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. **Carbohydrate polymers**, v. 157, p. 567-575, 2017.

RAAD, I. *et al.* Antibiotics and prevention of microbial colonization of catheters. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 11, p. 2397-2400, 1995.

RASKIN, I. *et al.* Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522–531, 2002.

RAVAL, Y. S. *et al.* Hydrogen-Peroxide-Generating Electrochemical Scaffold Eradicates Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Global Challenges**, v. 3, n. 6, p. 1800101, 2019.

RIBEIRO, K. A.L. *et al.* Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Acta tropica**, v. 111, n. 1, p. 44-50, 2009.

RIFFEL, A. *et al.* In vitro antimicrobial activity of a new series of 1, 4-naphthoquinones. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 35, n. 7, p. 811-818, 2002.

ROSSITER, S. E.; FLETCHER, M. H.; WUEST, W. M. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. **Chemical reviews**, v. 117, n. 19, p. 12415-12474, 2017.

SALAZAR-ARANDA, R. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, n. 536139, p. 1-6, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep127>.

Diponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/536139/abs/>. Acesso em: 18 junho 2018.

SANTOS, M. M. M *et al.* Reaction of naphthoquinones with substituted nitromethanes. Facile synthesis and antifungal activity of naphtho [2, 3-d] isoxazole-4, 9-diones. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 1, p. 193-195, 2010.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

SHALLCROSS L. J. *et al.* The role of the Pantone- Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v.13, p.43–54, 2013.

SHARMA, V.K.; ASATI, D.P. Pediatric contact dermatitis. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 76, n. 5, p.514–520, 2010.

SILVA, L. N. *et al.* Plant natural products targeting bacterial virulence factors. **Chemical reviews**, v. 116, n. 16, p. 9162-9236, 2016.

SINGH, S. B. Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 16, p. 3683-3689, 2014.

SINGH, P; PANDA, D. FtsZ inhibition: a promising approach for antistaphylococcal therapy. **Drug news & perspectives**, v. 23, n. 5, p. 295-304, 2010.

SOUZA, M. A. *et al.* The antimicrobial activity of lapachol and its thiosemicarbazone and semicarbazone derivatives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 342-351, 2013.

SREELATHA, T. *et al.* Synthesis and SAR study of novel anticancer and antimicrobial naphthoquinone amide derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 15, p. 3647-3651, 2014.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

STEPHENS, J.; DAVIES, L. The war on superbugs. **Script Magazine**, v. 2401, p. 44–47, 2008.

STREMPEL, N.; STREHMEL, J.; OVERHAGE, J. Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 1, p. 67-84, 2015.

SUTO, Y. *et al.* Synthesis and biological evaluation of quinones derived from natural product komaroviquinone as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 15, p. 2967-2971, 2015.

TARODA, N.; GIBBIS, P. Studies on the genus *Cordia* L. (Boraginaceae) in Brazil. 2. An outline taxonomic Revision of Subgenus MYXA TARODA. **Hoehnea**, v. 14, p. 31-52, 1987.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia. 10a ed. Porto Alegre: Artmed**, 2012.

TSUKATANI, T. *et al.* Distinction of Gram-positive and -negative bacteria using a colorimetric microbial viability assay based on the reduction of water-soluble tetrazolium salts with a selection medium. **The Journal of Geneneral and Applied Microbiology**, v. 57, p. 331–339, 2011.

VAN HORN, K. S. *et al.* Antibacterial activity of a series of N 2, N 4-disubstituted quinazoline-2, 4-diamines. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 7, p. 3075-3093, 2014.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

VINDEL, A. *et al.* Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: 2004–12. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 11, p.2913–2919, 2014.

WALSH, C. T.; WENCEWICZ, Timothy A. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. **The Journal of antibiotics**, v. 67, n. 1, p. 7-22, 2014.

WANG, X. *et al.* Effect of berberine on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 1, p. 60-6, 2009.

WANG, J. *et al.* Antibacterial activity of juglone against *Staphylococcus aureus*: from apparent to proteomic. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 965, p. 1-12, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17060965>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/6/965>. Acesso em: 14 Dezembro 2018.

WENDLANDT, A. E.; STAHL, S. S. Modular O-quinone catalyst system for dehydrogenation of tetrahydroquinolines under ambient conditions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 34, p. 11910-11913, 2014.

WILLIAMS, P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. **Microbiology**, v. 153, n. 12, p. 3923-3938, 2007.

WHO. World Health Organization. **The top 10 causes of death**. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Acesso em: 05 fevereiro 2018.

WOO, H.J., *et al.* Anti-inflammatory action of 2-carbomethoxy-2,3-epoxy-3-prenyl-1,4-naphthoquinone(CMEP-NQ) suppresses both the MyD88-dependent and TRIF-dependent pathways of TLR4 signaling in LPS-stimulated RAW264.7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 205, n. 1, p. 103-115, 2017.

XIANG, H. *et al.* Aloe-emodin inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms and extracellular protein production at the initial adhesion stage of biofilm development. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 17, p. 6671-6681, 2017.

YAJIMA, A. *et al.* Synthesis and absolute configuration of cordiaquinone K, antifungal and larvicidal meroterpenoid isolated from the Panamanian plant, *Cordia curassavica*. **Tetrahedron letters**, v. 44, n. 36, p. 6915-6918, 2003.

YAJIMA, A. *et al.* Synthesis of cordiaquinone J and K via B-alkyl Suzuki-Miyaura coupling as a key step and determination of the absolute configuration of natural products. **Tetrahedron**, v. 61, n. 38, p. 9164-9172, 2005.

YANG, J-Y; LEE, H-S. Antimicrobial activities of active component isolated from *Lawsonia inermis* leaves and structure-activity relationships of its analogues against food-borne bacteria. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 4, p. 2446-2451, 2015.

YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D.; SUFFREDINI, I.B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v. 62, n. 6, p. 763-8, 2007.

ZHAO, M. *et al.*, Structure-activity relationship of indoloquinoline analog anti-MRSA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 23, p. 5551–5554, 2015.

ZMANTAR, T. *et al.* Modulation of drug resistance and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* isolated from the oral cavity of Tunisian children. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 27-34, 2017.