



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

RAÍ EMANUEL DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE
ONCOCALIXONA A: UMA BENZOQUINONA ISOLADA DE *Auxemma oncocalyx*
Taub (BORAGINACEAE)**

TERESINA – PI

2019

RAÍ EMANUEL DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE
ONCOCALIXONA A: UMA BENZOQUINONA ISOLADA DE *Auxemma oncocalyx*
Taub (BORAGINACEAE)**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portella, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares.

TERESINA – PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCS
Serviço de Processamento Técnico

S586a Silva, Raí Emanuel da.
Avaliação do potencial antimicrobiano e antibiofilme de Oncocalixona A :
uma benzoquinona isolada de *Auxemma oncocalyx* Taub (Boraginaceae) / Raí
Emanuel da Silva. -- Teresina, 2019.
106 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares.
Bibliografia

1. Plantas medicinais. 2. Resistência microbiana. 3. Biofilme. 4.
Quinonas. I. Título.

CDD 615.32

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. Por todo esse tempo, o seu amor e o seu poder, constantes em minha vida, fizeram-se presentes, servindo como meu alicerce para chegar até aqui. Gratidão à Ti Senhor Deus de misericórdia, por me permitir alcançar novos voos e batalhar pela realização dos meus sonhos. Em segundo lugar, dedico à minha família, em especial aos meus pais, por me permitirem alcançar os meus objetivos, realizar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

O sentimento de gratidão por mais esta conquista é grandioso.

Agradeço incansavelmente à Deus pelo dom da vida. Por ser meu refúgio, minha fortaleza, minha base. Obrigado Senhor, por me encorajar quando nem eu mesmo acreditei em mim. Por me fazer ir além, buscando sempre dar o meu melhor, em tudo o que me proponho a fazer. Por ser a minha fonte de energia. Eterna Gratidão!

Agradeço aos meus pais, Pedro e Aparecida, e às minhas irmãs, Renata e Ravenna, por acreditarem e depositarem confiança em mim. Pai, mãe! A minha ausência foi e é por um bom motivo, para que tudo um dia possa eu possa retribuí-los da melhor forma possível tudo o que fizeram e fazem por mim. Obrigado por não me deixarem fraquejar e por servirem de fontes de inspiração para que eu me tonasse o ser humano que sou hoje. Obrigado por tudo!

À Irismara Sousa, por me incentivar a prestar a seleção do Programa e me fazer acreditar que eu seria capaz de conquistar a aprovação.

À toda a minha turma de Mestrado (2017), por todas as experiências vividas, os conhecimentos transmitidos, brincadeiras e risadas em momentos de descontração. Agradeço, especialmente, as minhas companheiras assíduas desta grande jornada: Ingredy Lopes, Isabela Nolêto e Joselma Lacerda. O nosso Gastrobianos sem dúvidas será uma das valiosas conquistas.

Às minhas grandes amigas Alda Cássia, Cristina Martins e Ingredy Lopes, por terem me acompanhado a todo instante nessa trajetória árdua. Obrigado por sempre estarem comigo, por não me deixarem desistir e por sempre serem o ponto de apoio e fortaleza. Amo vocês.

À Ingredy Lopes, em especial, por ter ingressado comigo nesse grande desafio e por ter superado ao meu lado, muitos limites e dificuldades. Obrigado minha amiga, por não ter me deixado fraquejar, por ter estado sempre ao meu lado, me fazendo acreditar que tudo seria passageiro e que ao final disso tudo estaríamos felizes por termos alcançado mais esse grande objetivo. Amo você.

Aos meus demais amigos por compreenderem os momentos de ausência, por entenderem que nem sempre foi possível estar com vocês, por abdicar de muitos momentos juntos, em detrimento das atividades e obrigações. Obrigado por serem um ponto de apoio e refúgio diante das dificuldades desta trajetória.

Eterna gratidão à João Vitor Matos dos Santos, por ter estado comigo durante boa parte esse caminho, fornecendo-me todo o apoio necessário, me confortando e dando-me forças para prosseguir nesse desafio. Obrigado por tudo!

À Alexander Frederick Viana do Lago, por ser um ser humano incrível, amigo e assíduo, em me confortar nos momentos de fraqueza, sempre me incentivando a continuar. Obrigado!

Ao Pedro Lago de Almeida Silva por ter me acompanhado, mesmo já na reta final, sempre me dando todo o apoio, incentivo e palavras de conforto, que me fizeram refletir e acreditar que tudo estava chegando ao fim. Obrigado por estar comigo e me encorajar na finalização deste trabalho. Obrigado por todas as trocas de experiências, por todas as conversas, pelo companheirismo e pela cumplicidade! Obrigado por toda a representatividade que você tem e o quão especial tem se tornado! Gratidão por tudo!!!

À minha primeira e maior fonte de inspiração para adentrar no mundo acadêmico: Profa. Dra. Fernanda Machado Fonseca. Obrigado por ter acreditado em mim e sempre ter me incentivado a seguir este caminho, dando-me todo o suporte para encará-lo. Obrigado pela parceria de sempre!

À toda a galera do Laboratório de Doenças Infecciosas, do Laboratório de Sanidade Animal - LASAN (Vitória, Ítala, Leonardo, Arthur e Felipe), por todo o conhecimento repassado pela troca de experiências na etapa inicial desse longo caminho.

Ao Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC, por todo o suporte e estrutura para a realização desse trabalho, fornecendo-me subsídios para finalizar esse estudo.

Às minhas Candy Crush, Gisele, Layla e Mariana, pelos momentos de desabafos, conversas, mensagens de apoio e todo incentivo dado um ao outro para que pudéssemos traçar esse caminho com mais leveza e descontração.

Aos amigos maravilhosos que fiz no convívio diário da rotina do laboratório, deixando todas as atividades sempre prazerosas. Bruno, Fábio, Manoel, Higina, Ayslan e Jéssica Teles, Mayck, Káritta, Maria Gabriela por caminharem diariamente comigo nesta trajetória, compartilhando conhecimentos, ideias e deixando-a mais animada e descontraída.

À Dra. Alyne Araújo por toda a paciência, ensinamentos, conhecimentos repassados e trocas de experiências vivenciadas, durante todo esse período. Obrigado pelo incentivo, por acreditar em mim e por representar essa fonte de inspiração que és, tornando divertido e prazeroso fazer Ciência. Esse trabalho também é seu!

Ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará - UFC, na pessoa da Profa. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa, pela doação da substância aqui estudada.

Ao Laboratório de Cultura de Células do Delta, na pessoa dos professores Dr. Delano Barreto e Dra. Ana Jérсия, por intermediarem a parceria junto à UFC.

Ao Grupo de Estudos Avançados em Micologia Médica – GEAMICOL, pela colaboração com os ensaios antifúngicos.

Ao Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais – NPPM e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, por todo o suporte para minha formação.

À Universidade Federal do Piauí, por toda a estrutura e por ser a minha segunda casa por muitos anos.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de estudos.

Por fim, agradeço imensamente à minha Orientadora Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares, pela parceria, orientação, conhecimentos e ensinamentos repassados. Agradeço-a por ter aceito o desafio de me inserir na Microbiologia, contribuindo expressivamente para minha formação profissional e acadêmica. A senhora é um grande exemplo a seguir!!! Obrigado, Professora!

RAÍ EMANUEL DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DE
ONCOCALIXONA A: UMA BENZOQUINONA ISOLADA DE *Auxemma oncocalyx*
Taub (BORAGINACEAE)**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portella, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

APROVADA EM 08 / JUNHO / 2019.


BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. RAIZZA EVELINE ESCÓRCIO PINHEIRO
Examinador externo



Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA MENESES OLIVEIRA
Examinador interno



Profa. Dra. MARIA JOSÉ DOS SANTOS SOARES
Presidente

TERESINA – PI

2019

SILVA, R. E. da. Avaliação do potencial antimicrobiano e antibiofilme de Oncocalixona A: uma benzoquinona isolada de *Auxemma oncocalyx* Taub (Boraginaceae). [Dissertação]. Piauí: Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí; 2019.

RESUMO

A resistência antibiótica desenvolvida pelos micro-organismos, incluindo bactérias e fungos, apresenta-se como um grave problema de saúde pública mundial que torna desafiador a terapêutica para estes agentes patogênicos. Desta forma, a busca por novas opções antimicrobianas que possam superar este obstáculo torna-se indispensável. *Auxemma oncocalyx* Taub (Boraginaceae), é uma espécie nativa da biodiversidade brasileira que tem demonstrado diversas propriedades biológicas/farmacológicas e seu constituinte majoritário, Oncocalixona A (Onco A), uma benzoquinona obtida do cerne do caule, tem apresentado efeitos anti-inflamatório, analgésico, antitumoral e capacidade de inibir a agregação plaquetária. O potencial antimicrobiano de diferentes quinonas tem sido relatado, contudo, não há dados sobre a Onco A. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme, frente a espécies bacterianas e fúngicas de interesse clínico, bem como a biocompatibilidade de Onco A. Linhagens de bactérias Gram positivas e Gram negativas, e de fungos filamentosos e leveduriformes foram avaliadas, para a determinação das Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM), deste metabólito. A ação inibitória na formação de biofilmes foi investigada sob concentrações equivalentes a 1/2, 1/4 e 1/8 da CIM. A biocompatibilidade desta substância foi analisada utilizando eritrócitos humanos, nas mesmas concentrações estabelecidas no ensaio antimicrobiano. O efeito antibacteriano produzido pela Onco A foi avaliado por Microscopia de Força Atômica (MFA), bem como pelo envolvimento do estresse oxidativo. Onco A foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, em concentrações variáveis, sendo a linhagem *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, a mais sensível à sua ação com CIM de 9,43 µg/mL. Houve também inibição do crescimento de *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MED 55 (resistente a metilicina), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175, com CIMs entre 18,87 e 75,5 µg/mL. Onco A, ainda, inibiu o crescimento das espécies Gram negativas *Stenotrophomas maltophilia* e *Acinetobacter baumannii*, que possuem poucas opções terapêuticas. Os dados obtidos revelaram que esta molécula apresenta um efeito bacteriostático, com CBM superior a 151 µg/mL. Onco A apresentou maior potencial antibiofilme para a cepa de *S. aureus* MED 55, inibindo, ainda, em 20% a formação do biofilme da linhagem *S. epidermidis* 70D. Atividade antifúngica não foi evidenciada sobre as espécies avaliadas. A ação deste metabólito sob eritrócitos humanos, não apresentou atividade hemolítica. A MFA revelou alterações estatisticamente significativas no tamanho e rugosidade média das células bacterianas avaliadas, aos comparados ao controle, provocadas pela Onco A. A ação antibacteriana desta molécula não está relacionada com estresse oxidativo. Os resultados obtidos, demonstram o potencial antibacteriano, desta benzoquinona, servindo como opção promissora no desafio da resistência antibiótica.

Palavras-chaves: Plantas medicinais, resistência microbiana, biofilme, quinonas.

SILVA, R. E. da. Evaluation of the antimicrobial and antibiotic potential of Oncocalixone A: a benzoquinone isolated from *Auxemma oncocalyx* Taub (Boraginaceae). [Dissertação]. Piauí: Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Piauí; 2019.

ABSTRACT

The antibiotic resistance developed by microorganisms, including bacteria and fungi, has been a serious global public health problem, which makes therapy against these pathogenic agents challenging. Thus, searching for new antimicrobial options capable of solving this problem is necessary. *Auxemma oncocalyx* Taub (Boraginaceae), is a native species of Brazilian biodiversity that has shown several biological/pharmacological properties and its major constituent, Oncocalixone A (Onco A), a benzoquinone obtained from the stem heart, has shown anti-inflammatory, analgesic, antitumor and ability to inhibit platelet aggregation. The antimicrobial potential of different quinones has been reported, however, there is no data on Onco A. Then, the objective of the present study was to evaluate antimicrobial and antibiofilm activity, against clinical species of bacteria and fungi, as well as biocompatibility of Onco A. Strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria and filamentous fungi and yeasts were evaluated using CLSI protocols to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of this metabolite. Its action in inhibiting the formation of biofilms was also investigated at concentrations equivalent to 1/2, 1/4 and 1/8 of MIC. The biocompatibility of this substance was analyzed using human erythrocytes at the same concentrations established in the antimicrobial assay. The antibacterial effect produced by Onco A was evaluated by Atomic Force Microscopy (MFA), as well as by the involvement of oxidative stress. Onco A was able to inhibit bacterial growth, at variable concentrations, and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 was more sensitive to its action with an MIC value of 9.43 µg/mL. There was also growth inhibition of *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* MED 55 (methicillin resistant), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Streptococcus mutans* ATCC 25175 presenting MIC values between 18.87 and 75.5 µg/mL. Onco A also inhibited the growth of Gram-negative bacteria, *Stenotrophomas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*, which have few therapeutic options. The data showed that this molecule has a bacteriostatic effect, with CBM higher than 151 µg/mL. Onco A showed a higher antibiofilm potential on *S. aureus* MED 55 strain, inhibiting in 20% the biofilm formation of *S. epidermidis* 70D strain. No antifungal activity was demonstrated on the evaluated species. The action of this metabolite on human erythrocytes did not reveal hemolytic activity at the tested concentrations. MFA revealed statistically significant changes in the size and average roughness of the bacterial cells evaluated, compared to the control, caused by Onco A. The antibacterial action of this molecule is not related to oxidative stress. The results obtained demonstrate the antibacterial potential of this benzoquinone, serving as a promising option in the challenge of antibiotic resistance.

Keywords: Medicinal plants, microbial resistance, biofilm, quinones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais alvos dos antibióticos.	19
Figura 2 – Principais mecanismos de resistência antibiótica.	22
Figura 3 – Etapas da formação do biofilme bacteriano.	27
Figura 4 – Alvos celulares dos principais antifúngicos.	30
Figura 5 – Classificação das quinonas de acordo com o sistema aromático principal.	39
Figura 6 – Porte arbóreo de <i>Auxemma oncocalyx</i> Taub (Boraginaceae).	43
Figura 7 – Estrutura química de Oncocalixona A (Onco A).	44
Figura 8 – Diagrama da obtenção de Oncocalixona A (Onco A).	52
Figura 9 – Desenho experimental do teste de determinação da CIM <i>in vitro</i> de Onco A.	58
Figura 10 – Desenho esquemático do teste de determinação da CBM de Onco A.	58
Figura 11 – Desenho experimental do ensaio antifúngico <i>in vitro</i> de Onco A.	61
Figura 12 – Estudo do efeito antibacteriano de Onco A pelo envolvimento do estresse oxidativo.	64
Figura 13 – Esquema do ensaio de Biocompatibilidade de Onco A, em triplicata.	65
Figura 14 – Percentual de crescimento bacteriano no tratamento com Onco A frente as linhagens de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 e <i>S. aureus</i> ATCC 29213.	69
Figura 15 – Efeito de Onco A na inibição da formação inicial dos biofilmes de <i>S. epidermidis</i> 70 D e <i>S. aureus</i> MED 55.	70
Figura 16 – Efeito de Onco A na ação bactericida contra <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, em função do tempo.	71
Figura 17 – Imagens por MFA do tratamento com Onco A e antibiótico padrão (Vancomicina) para a cepa <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644.	73
Figura 18 – Imagens por MFA no tratamento com Onco A e antibiótico padrão para a cepa <i>S. maltophilia</i> EM0104.	74
Figura 19 – Imagens por MFA do tratamento com Onco A e antibiótico padrão para a cepa <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	75
Figura 20 – Alterações da média de tamanho e da rugosidade média após o tratamento com Onco A e antibiótico padrão para as linhagens bacterianas <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644, <i>S. maltophilia</i> EM0104 e <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	76
Figura 21: Participação das espécies reativas de oxigênio no efeito antibacteriano de Oncocalixona A contra a linhagem <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mecanismos de resistência envolvidos com as principais classes de antibióticos	24
Tabela 2 - Mecanismos de resistência aos principais antifúngicos	32
Tabela 3 - Espécies bacterianas utilizadas para avaliação do potencial antibacteriano de Onco A.	53
Tabela 4 - Espécies fúngicas utilizadas para avaliação do potencial antifúngico de Onco A.	53
Tabela 5 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) de Onco A para atividade antibacteriana <i>in vitro</i> .	67
Tabela 6 - Valores de CIM ₅₀ para a atividade antibacteriana <i>in vitro</i> de Onco A.	68
Tabela 7 - Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de Onco A para atividade antifúngica <i>in vitro</i>	70

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS e ABREVIações

- AA – ácido araquidônico
- AcOEt – Acetado de Etila
- ADP – Difosfato de adenosina
- AGE – Advanced glycation end products (Produtos finais de glicação avançada)
- ATCC – American Type Culture Collection
- CBM – Concentração Bactericida Mínima
- CEM – Células leucêmicas
- cGMP – Monofosfato de guanosina cíclico
- CHCl₃ – Clorofórmio
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EROS – Espécies reativas de oxigênio
- EtOH – Etanol
- GP –Glicoproteína
- i.p – Intraperitoneal
- IRAS – Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
- MeOH – Metanol
- MFA – Microscopia de Força Atômica
- MOA – monoaminas oxidase
- MOPs – 3-(N-morfolino) propano ácido sulfônico
- MOs – Micro-organismos
- MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
- NO – Óxido nítrico
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- Onco A – Oncocalixona A
- Poly A – Ácido poliadenílico

PRP – Plasma rico em plaquetas

RMN – Ressonância magnética nuclear

ssDNA – DNA fita simples

TGO – Transaminase glutâmico-oxalacética

TGP – Transaminase glutâmico-pirúvica

TSA – Tryptic Soy Agar (Agar Tripticaseína de Soja)

TSB – Tryptic Soy Broth (Caldo Tripticaseína de Soja)

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UV-vis – Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1. USO DE ANTIBIÓTICOS NO TRATAMENTO DAS INFECÇÕES BACTERIANAS.....	18
2.2. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA	20
2.3. BIOFILME COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA.....	25
2.4. USO DE ANTIFÚNGICOS NO TRATAMENTO DAS INFECÇÕES FÚNGICAS	27
2.5. RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS.....	30
2.6. REFLEXO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA SAÚDE PÚBLICA ..	33
2.7. AS PLANTAS MEDICINAIS E SEUS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	35
2.8. QUINONAS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	38
2.9. ONCOCALIXONA A.....	42
2.9.1. Obtenção e caracterização do material	42
2.9.2. Potencial biológico de Oncocalixona A	44
3. OBJETIVOS	50
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL.....	51
4.2. MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS	52
4.2.1. Espécies Bacterianas	52
4.2.2. Espécies Fúngicas.....	53
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ONCOCALIXONA A	54
4.3.1. Confirmação da pureza das espécies bacterianas	54
4.3.2. Cultivo bacteriano para os experimentos de avaliação da ação antimicrobiana da Onco A.....	55
4.3.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM	55
4.3.4. Determinação da Concentração Bactericida Mínima.....	57
4.3.5. Inibição da formação do biofilme	59
4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ONCOCALIXONA A.....	60
4.4.1. Cultivo fúngico e preparação do inóculo para os experimentos	60
4.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima	60
4.5. ESTUDO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DE ONCOCALIXONA A.....	62
4.5.1. Curva de Morte	62
4.5.2. Análise por Microscopia de Força Atômica	62
4.5.3. Envolvimento do estresse oxidativo no efeito antibacteriano de Onco A	63
4.6. ENSAIO DE BIOCOMPATIBILIDADE	64
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
5. RESULTADOS	66

5.1. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>in vitro</i> DE ONCOCALIXONA A.....	66
5.2. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO INICIAL DO BIOFILME	69
5.3. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ONCOCALIXONA A	70
5.4. ESTUDO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DE ONCOCALIXONA A.....	70
5.4.1. Curva de morte	70
5.4.2. Análise por Microscopia de Força Atômica	71
5.4.3. Envolvimento do estresse oxidativo no efeito antibacteriano de Oncocalixona A.....	77
5.5. ENSAIO DE BIOCAMPATIBILIDADE	78
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS.....	90

1. INTRODUÇÃO

As primeiras suspeitas de enfermidades sendo provocadas por “minúsculas partículas invisíveis”, ocorreram ainda na Idade Média, quando o médico italiano Francastorius descreveu o surgimento de muitas doenças epidêmicas e transmissíveis pelo contágio de pessoa a pessoa. Estas “partículas invisíveis” constituem o imenso mundo dos micróbios ou também denominados micro-organismos (MOs) (PELCZAR JUNIOR et al., 2007).

Neste sentido, a entrada de um patógeno em um hospedeiro susceptível, o que representa um mecanismo de invasão, caracteriza as reconhecidas doenças infecciosas. Estas então podem ser consideradas como um processo pelo qual tais agentes são capazes de reproduzir parte do seu ciclo de vida naquele organismo, o que de acordo com a susceptibilidade deste e os mecanismos de patogenicidade dos MOs, podem resultar no estabelecimento de um quadro infeccioso (SILVA, 2012). Este por sua vez, pode ser desencadeado pelos mais diferentes grupos de seres microbianos, o que inclui as bactérias, os vírus, os fungos, bem como os parasitas.

Dentre esses quatro grandes grupos, as bactérias e os fungos destacam-se por estarem bastante relacionados com a ocorrência de infecções tanto na comunidade como no ambiente hospitalar, de tal forma que a interação entre esses agentes infecciosos e os mais diversos sistemas/órgãos pode conduzir a processos patológicos que muitas vezes podem levar o paciente a óbito (FAIR; TOR, 2014).

Deste modo, considerando a ocorrência desses quadros clínicos, a inserção dos fármacos antimicrobianos, na prática médica humana, representou um avanço importante para o tratamento de diversas doenças, reduzindo assim as elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Neste processo, os MOs causadores destas infecções são constantemente submetidos a uma enorme pressão seletiva, tendo por objetivo sua eliminação e/ou diminuição da sua habilidade reprodutiva. Entretanto, a capacidade de se adaptarem à presença dos antimicrobianos têm tornado esses patógenos resistentes às ações destas substâncias, merecendo assim uma importante atenção (WALDVOGEL, 2004; SCHAECHTER et al., 2009).

É notória a contribuição do uso de antimicrobianos para o tratamento de uma diversidade de enfermidades infectocontagiosas humanas ou veterinárias. Comercialmente, observa-se a presença de diversos fármacos desenvolvidos com princípios ativos diferenciados, capazes de eliminar e/ou diminuir a presença

desses agentes patogênicos. Entretanto, fatores genéticos, e o uso indiscriminado destes fármacos tem contribuído significativamente para a aquisição de diferentes mecanismos de resistência pelos MOs (MOTA et al., 2005).

A resistência aos antibióticos adquirida por muitas bactérias foi, tem sido e, muito provavelmente, continuará sendo um grave problema de saúde pública mundial provocando infecções no ambiente hospitalar e em comunidades, o que conduz a altos índices de mortalidade (FRIERI et al., 2017). Da mesma forma, as infecções fúngicas também apresentam elevadas taxas de morbimortalidade, aumentando cada vez mais a incidência de Infecções Fúngicas Hospitalares (IFH) (PLUIM et al., 2012).

Além da resistência direta aos antibacterianos e aos antifúngicos, as bactérias e os fungos, respectivamente, são capazes de desenvolver outras maneiras para escaparem da ação de muitos inibidores, por meio da formação de biofilme. Esse representa uma das formas de vida microbiana, caracterizado como uma comunidade de micro-organismos que estabelecem uma ligação entre si e também com uma superfície abiótica ou biótica, mantida através da produção de substâncias secretadas pelos MOs presentes nesse ambiente (SULISTYANI et al., 2016).

Devido a ascendente aquisição de resistência por parte destes MOs, bem como do desenvolvimento de biofilmes observa-se a necessidade urgente do surgimento de novos fármacos antibióticos, bem como aprimoramento dos antimicrobianos já existentes ou ainda alternativas que em conjunto possam fornecer atividade eficaz contra os mecanismos desenvolvidos por estes patógenos. Nesse contexto, produtos naturais ainda pouco explorados podem resultar na descoberta de compostos biologicamente ativos e desta forma podem representar fontes promissoras na busca de novos antibióticos (GUIMARÃES et al., 2010).

A utilização de produtos naturais com propriedades medicinais é uma realidade em constante crescimento, tanto na prática popular como também na pesquisa científica. Atualmente em regiões em desenvolvimento, bilhões de pessoas têm utilizado plantas medicinais e outros produtos naturais como alternativas para o tratamento de uma ampla variedade de doenças infecciosas (VAN VUUREN; HOLL, 2017). No Brasil, nos últimos anos, verificou-se um aumento significativo na investigação com produtos naturais que apresentam atividade antimicrobiana, sendo que compostos farmacologicamente ativos oriundos de plantas medicinais ocupam um papel de destaque neste campo (SIMONETTI et al., 2016).

Substâncias produzidas por estas plantas medicinais e que apresentem capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos ou eliminá-los definitivamente, apresentam-se como uma importante alternativa terapêutica e, aliado a isto, a capacidade em diminuir a ocorrência de efeitos colaterais, se comparados com alguns antimicrobianos sintéticos, as tornam fontes propícias ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (AL-BAKRI; AFIFI, 2007).

Diante do problema da resistência bacteriana, neste trabalho, a ação antimicrobiana e antibiofilme da Oncocalixona A, uma benzoquinona isolada de *Auxemma oncocalyx* Taub foi investigada, frente a diferentes bactérias e fungos, que possuem elevado potencial patogênico humano e animal, buscando contribuir com dados sobre o potencial terapêutico deste produto natural.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. USO DE ANTIBIÓTICOS NO TRATAMENTO DAS INFECÇÕES BACTERIANAS

O potencial patogênico de uma bactéria está diretamente relacionado com a sua capacidade de provocar uma infecção. Desta forma, muitas espécies desse diferenciado grupo de micro-organismos (MOs), desde épocas remotas e até as atuais, tem provocado enfermidades diversas que apresentam elevadas taxas de morbidade e/ou mortalidade humana ou animal (DAVIES; DAVIES, 2010).

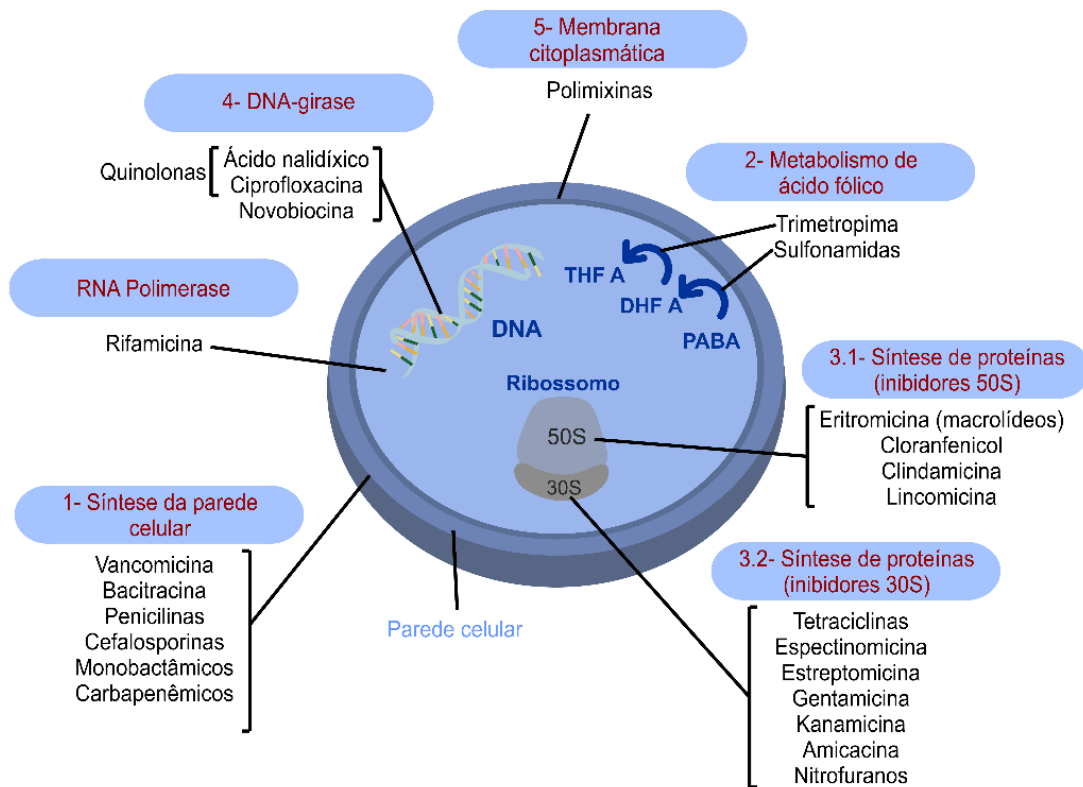
A gravidade de muitas infecções bacterianas e os numerosos casos de mortalidade decorrentes destas, tornaram a descoberta da Penicilina, em 1928, por Alexander Fleming, uma importante alternativa no combate a estas infecções e que inaugurou, historicamente, a “Era de Ouro” do desenvolvimento de antibióticos (PEREIRA; PITA, 2005; LUEPKE et al., 2017). O termo antibiótico pode ser definido como compostos de origem natural, capazes de desempenhar dois efeitos básicos frente às bactérias e desta maneira são considerados bacteriostáticos, quando apenas inibem o crescimento bacteriano ou bactericidas, quando apresentam ação letal frente a estes MOs (WALSH, 2004).

O desenvolvimento destes fármacos estimulou novos investimentos na área e foi responsável por muitos avanços na indústria farmacêutica, e ainda mais importante, conduziu à cura de doenças infecciosas bacterianas para as quais não se apresentavam opções terapêuticas eficazes (PEREIRA; PITA, 2005). Ao final da década de 40, quando os antibióticos se estabeleceram como fármacos de escolha para os tratamentos dessas infecções evidenciou-se uma diminuição acentuada dos números de óbitos decorrentes de doenças como pneumonia, tuberculose e outras infecções graves, como por exemplo meningites bacterianas e endocardites (IOM, 2010; FRIEDMAN, et al., 2016). Os efeitos satisfatórios apresentados por estes medicamentos contribuíram para o aumento da expectativa de vida como reflexo de inúmeras vidas salvas após o uso de antibióticos (DAVIES; DAVIES, 2010; PIDDOCK, 2012).

Enquanto opções terapêuticas que exercem ações seletivas frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, os antibióticos atuam em pelo menos cinco diferentes alvos celulares (**Figura 1**), alterando assim a síntese de componentes ou estruturas fundamentais para a sobrevivência bacteriana. Esses alvos incluem: 1) a

enzima transpeptidase, inibindo a síntese da camada de peptidoglicano, principal componente da parede celular; 2) a via metabólica do ácido fólico; 3) a síntese proteica bacteriana, atuando a nível das subunidades 30S e 50S dos ribossomos; 4) a DNA girase, bloqueando a replicação e reparo no DNA; e ainda 5) a permeabilidade da membrana plasmática (GUIMARÃES et al., 2010; RANG; DALE, 2011; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Figura 1: Principais alvos celulares dos antibióticos.



Fonte: Adaptado de KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017.

Com base nestes diferentes alvos celulares, muitos antibióticos foram desenvolvidos e assim tornaram-se opções terapêuticas promissoras contra esses patógenos. Dentre os diferentes fármacos que agem inibindo a síntese do peptidoglicano, destacam-se: a classe dos β -lactâmicos, representado pelas penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas, além dos carbapenêmicos, e monobactâmicos e a classe dos glicopeptídeos, constituído pela vancomicina, teicoplanina e os novos derivados lipoglicopeptídeos telavancin, dalbavancin e oritavancin (ZENG et al., 2016). Por outro lado, a nível de inibição da síntese proteica, as tetraciclina, os anfenícois, os aminoglicosídeos e os macrolídeos, são os principais

exemplos de fármacos que atuam ligando-se às subunidades ribossômicas (GUIMARÃES et al., 2010; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

O ácido fólico corresponde a um elemento essencial para síntese de DNA e RNA bacterianos. As sulfonamidas, enquanto análogos estruturais do ácido *p*-aminobenzoico (PABA), principal precursor do ácido fólico, alteram a via metabólica deste composto orgânico, por competirem pela enzima di-hidropteroato sintetase e desta maneira comprometem a síntese de componentes importantes para o desenvolvimento bacteriano, tais como aminoácidos e alguns nucleotídeos (ETEBU & ARIKEKPAR, 2016). Outros fármacos que atuam bloqueando a replicação do DNA, inviabilizando a multiplicação do MO; são as fluoroquinolonas, que incluem a ciprofloxacina e levofloxacina. Como opções de antibióticos cuja ação envolve alteração da permeabilidade da membrana plasmática, com consequente desequilíbrio eletrolítico na célula e/ou do conteúdo celular, temos o polipeptídeo, polimixina B e lipopeptídeo daptomicina (RANG; DALE, 2011; ETEBU; ARIKEKPAR, 2016; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Por suas propriedades eficazes e pelo amplo espectro de ação demonstrado por muitos destes fármacos, a utilização destes tornou-se algo cada vez mais recorrente, promovendo assim a redução de muitas doenças bacterianas de maneira significativa. Contudo, o consumo destes medicamentos cresceu exacerbadamente e resultou em problemas graves, como a elevação dos gastos em saúde e erros na prescrição destas substâncias antimicrobianas, decorrentes da incerteza diagnóstica ou ainda de um conhecimento farmacológico inapropriado (WANNMACHER, 2004). Entretanto, o desenvolvimento de mecanismos de resistência a estes fármacos, pelas bactérias se consagra como uma das mais importantes ameaças mundiais para o retorno da era pré antibiótica.

2.2. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

Embora a utilização dos antibióticos tenha revolucionado o tratamento dessas infecções, o uso indiscriminado destes fármacos originou um importante problema de Saúde Pública mundialmente conhecido: a resistência bacteriana. Esta característica pode ser definida como a capacidade que uma bactéria adquire para crescer *in vitro*, mesmo na presença da concentração do fármaco capaz de inibir o seu desenvolvimento (TAVARES, 2014). Entre tantos problemas decorrentes da ação destes medicamentos, a resistência aos antibióticos configura-se como o principal,

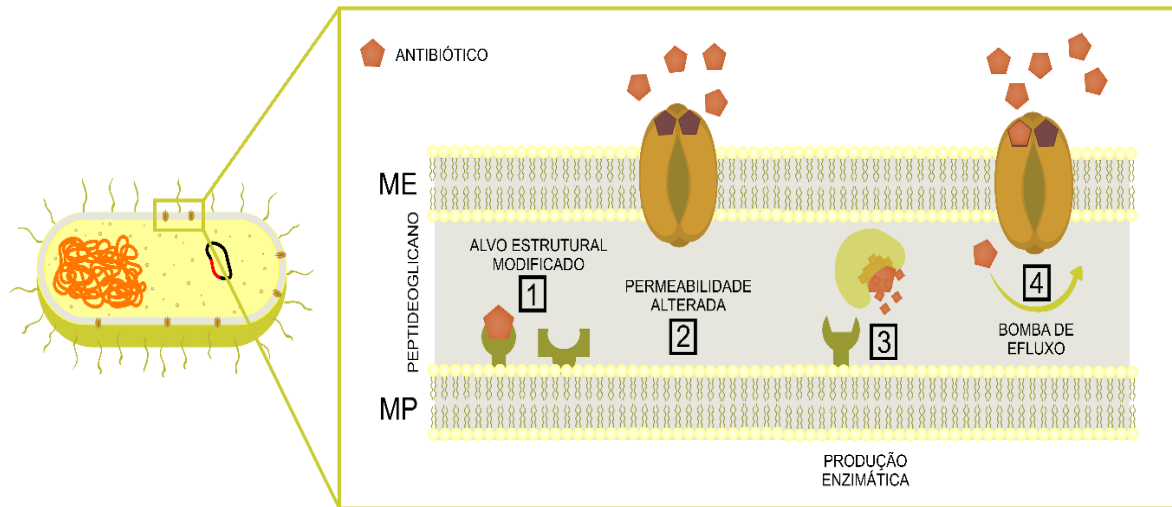
selecionando cada vez mais patógenos capazes de provocar graves quadros infecciosos que elevam as taxas de mortalidade provocadas por bactérias multirresistentes (WHO, 2014; COSTA; SILVA JÚNIOR, 2017).

A utilização dos antibióticos de maneira indiscriminada é a principal causa para o surgimento de resistência a estes fármacos entre os MOs, pois a exposição excessiva a estas substâncias favorece a pressão seletiva que possibilita a seleção das espécies mutantes, refletindo no surgimento de cepas capazes de promover infecções cada vez mais graves (LAXMINARAYAN et al., 2016).

A resistência bacteriana pode acontecer de forma natural ou adquirida. A primeira, corresponde à uma característica inerente a uma determinada espécie e configura-se uma herança genética. Enquanto isso, a resistência adquirida representa a aquisição deste fenômeno por cepas originalmente sensíveis a um grupo de antibióticos. Esta modalidade de resistência ocorre por meio de mutações ou aquisição de material genético exógeno móvel, tais como plasmídeos, transposons, ilhas de patogenicidade, fagos, que podem ser transferidos por diferentes mecanismos genéticos (conjugação, transformação e/ou transdução) e cujas alterações impedem a ação dos fármacos (OSÓRIO, 2011; TAVARES, 2014).

Conforme demonstrado na **Figura 2**, as bactérias expressam sua resistência aos antimicrobianos por diferentes mecanismos em quatro categorias principais: 1) desenvolvimento de alvos estruturalmente modificados na célula bacteriana, diminuindo assim sua afinidade à droga; 2) a redução da permeabilidade da membrana plasmática, o que impede que o fármaco alcance seus alvos intracelulares; 3) a produção de enzimas capazes de inativar o fármaco, por meio de alterações na parte ativa da molécula; ou ainda, 4) da expulsão do fármaco do seu interior, por meio da criação de uma bomba de efluxo, que conforme este penetra na célula bacteriana, ela consegue excretá-lo e assim inibir a sua ação (RATTI; SOUSA, 2009).

Figura 2: Principais mecanismos de resistência antibiótica.



Legenda: 1) Desenvolvimento de um alvo estrutural modificado; 2) Modificação na permeabilidade da membrana; 3) Produção de enzimas que degradam o fármaco; 4) Criação de uma bomba de efluxo. Fonte: Autoria própria, 2019.

Os relatos iniciais de resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos foram associados às espécies do gênero *Staphylococcus* sp. A resistência a esse fármaco por cepas de *Staphylococcus aureus*, originou-se pela produção de uma β -lactamase, uma enzima capaz de hidrolisar o anel β -lactâmico presente na estrutura química da penicilina e desta forma torná-la inativa (SANTOS et al., 2007; BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

A meticilina, um beta-lactâmico semissintético, foi desenvolvido para atuar inibindo a resistência produzida pela ação das β -lactamase, neste gênero microbiano. No entanto, logo surgiram relatos de resistência a este antibacteriano e que ficou evidenciado não estar relacionado a produção de uma nova β -lactamase, mas a síntese de um novo alvo. Assim, tais isolados passaram a ser denominados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA, do inglês Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Este mecanismo, quando presente, tornam os *Staphylococcus* spp. resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos (MRS; Methicillin resistant *Staphylococcus* (GELATTI et al., 2009; FOSTER, 2017).

A resistência das estirpes MRSA, ou MRS aos beta-lactâmicos semissintéticos ocorre por meio da expressão do gene *mecA*, que se encontra associado a um elemento genético móvel denominado cassete cromossômico estafilocócico mec

(SCC*mec*; Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*) (LIU et al., 2016; SABER et al., 2017). O gene *mecA*, na presença da meticilina, codifica para a produção de uma nova proteína de membrana plasmática, denominada de PBP2a ou PBP2' (UBUKATA et al., 1989). As PBPs (*Penicilin-Binding-Protein*) são proteínas responsáveis pelas ligações cruzadas entre as camadas de peptidoglicano na síntese da parede celular bacteriana e são alvos dos antibióticos beta-lactâmicos. Deste modo, a presença da PBP 2a confere aos *Staphylococcus* sp. resistência a meticilina, bem como as isoxazolilpenicilinas, representadas pela oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina e flucloxacilina, devido à baixa afinidade de ligação destes fármacos a esta proteína (RATTI; SOUSA, 2009; BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013; TAVARES, 2014; LIU et al., 2016; SABER et al., 2017).

Um outro exemplo de resistência, que se enquadra dentro dos mecanismos de desenvolvimento de um alvo estrutural modificado, relaciona-se à vancomicina. A ação promovida por este glicopeptídeo é mediada pela ligação à extremidade D-alanina-D-alanina de um pentapeptídeo precursor do peptidoglicano, sendo este seu sítio-alvo. As espécies resistentes a esse antibiótico produzem peptídeos com extremidades estruturalmente modificadas, como uma acil D-alanina-D-lactato, ou acil D-alanina-D-serina, reduzindo assim a afinidade da vancomicina ao seu sítio de ação (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1998; BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

Tendo em vista que o efeito dos fármacos depende da ação em seus alvos celulares, a alteração da permeabilidade da membrana resulta na diminuição da concentração de fármaco intracelularmente, o que compromete o resultado desejado. A presença da membrana externa em bactérias Gram negativas já confere naturalmente um antagonismo aos antibióticos, uma vez que sua permeabilidade é extremamente limitada e regulada por canais específicos conhecidos como porinas. A alteração nestes canais ou até mesmo a sua perda, conferem desta forma uma diminuição da entrada de substâncias antibacterianas (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013; MILLER, 2016).

Na **Tabela 1** estão apresentados os diferentes mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias a fármacos antimicrobianos.

Tabela 1: Mecanismos de resistência envolvidos com as principais classes de antibióticos.

CLASSE DE ANTIBIÓTICOS	TIPO DE RESISTÊNCIA	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA
Aminoglicosídeos	Reduzida captação da droga	Modificações na membrana externa
	Modificação enzimática	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
Beta-lactâmicos	PBP alteradas	PBP 2a
	Degradação enzimática	Penicilinases
Glicopeptídeos	Alvo alterado	D-alanina-D-alanina é modificada para D-alanina-D-lactato ou D-alanina-D-serina
Macrolídeos	Alvo alterado	Metilação do sítio ativo do ribossomo, diminuindo a ligação
	Bomba de efluxo	Bomba tipo Mef
Quinolonas	Alvo alterado	Mutação que conduz a diminuição da ligação ao sítio ativo
	Efluxo	Transportadores de membrana
Tetraciclina	Efluxo	Novos transportadores de membrana
	Alvo alterado	Produção de proteínas que se ligam ao ribossomo e alteram a conformação do sítio ativo

Fonte: Adaptada de KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017.

Além de conduzir a um agravamento das condições de saúde, com elevadas taxas de morbimortalidade, o problema da resistência antibiótica afeta todo o contexto médico-social, resultando em perda de produtividade da classe trabalhadora e um aumento expressivo nos custos com aquisição de novos medicamentos e prolongamento das internações, o que acarreta em risco para a ocorrência de complicações (FAIR; TOR, 2014). Assim, o problema da resistência bacteriana pode e já está a gerar impactos clínicos como resultado da diminuição de opções

terapêuticas eficazes (ARRUDA, 2016). Além destes clássicos mecanismos de resistências, os MOs evoluíram a ponto de desenvolverem habilidades que garantam sua sobrevivência nos mais diversos ambientes, e a produção de biofilme é o principal exemplo dessa evolução.

2.3. BIOFILME COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA

A ocorrência de falhas em um processo de higienização pode permitir a adesão de resíduos em superfícies e equipamentos capazes de se transformarem em uma potente fonte de contaminação. Por um mecanismo de adesão, em condições específicas, os MOs iniciam o crescimento celular a partir de uma interação com superfícies abióticas ou bióticas, formando assim comunidades complexas e dinâmicas, conhecidas como biofilmes (LYNCH; ROBERTSON, 2008; HUIJBERS et al., 2015). Cateteres, implantes médicos, próteses dentárias e superfícies de interesse industrial estão entre as áreas aptas à formação desta comunidade (LE; OTTO, 2015). Além das bactérias, os fungos, protozoários, microalgas e vírus também podem ser encontrados em associação nestes ambientes (FREY-KLETT et al., 2011).

Biofilmes são estruturas complexas metabolicamente ativas que se originam de comunidades mono ou poli microbianas, envolvidas por uma matriz polimérica extracelular, produzidas pelos próprios MOs (KIVES et al., 2006; RIBEIRO et al. 2016). Essa comunidade representa a criação de um ambiente dinamicamente homeostático, com utilização de todos os nutrientes presentes no meio (ABRAHAM, 2016). Tanto micro-organismos aeróbicos quanto anaeróbicos podem coexistir neste local, mantendo uma relativa distância entre um e outro. Os anaeróbicos estão restritos a camadas mais inferiores e na zona de transição observa-se a presença de bactérias facultativas, capazes de tolerar o oxigênio (SCHNEIDER, 2007).

Mais de 90% de todos os MOs apresentam capacidade de produzirem biofilmes, que podem ser também referidos como um depósito em que estes aderem fortemente a uma superfície, por meio de apêndices de natureza proteica ou de polissacarídeos, conhecida como glicocálice (MARQUES et. al., 2007). Este envoltório comumente constituído por exopolissacarídeos (EPS) pode ainda conter moléculas de proteínas, sais minerais, vitaminas, lipídeos e ácidos nucleicos e contribuem de forma significativa na determinação das características estruturais, morfológicas e fisiológicas dos biofilmes, atuando tanto na adesão celular como também conferindo proteção às células bacterianas, de forma a auxiliá-las na resistência contra condições

de estresse, diminuição de concentrações de água e nutrientes, bem como agentes antimicrobianos químicos e físicos (KIVES et al., 2006; VU et al., 2009; RIBEIRO et al. 2016).

A adsorção de moléculas orgânicas e inorgânicas a uma determinada superfície e que constitui uma camada condicionante, como por exemplo, resíduos proteicos e lipídicos, corresponde à primeira etapa de formação do biofilme (BOGINO et al., 2013).

O processo de adesão, é um mecanismo importante em que os colonizadores primários apresentam interações intermoleculares entre a parede celular dos MOs e as moléculas da camada condicionante, originada a partir dos resíduos do ambiente (KOKARE et al., 2009). Nessa etapa, a participação de estruturas bacterianas de adesão como fímbrias e flagelos, tem uma contribuição decisiva. A concentração de nutrientes e a afinidade das moléculas com a superfície são fatores determinantes nessa formação (CLONTS, 2008).

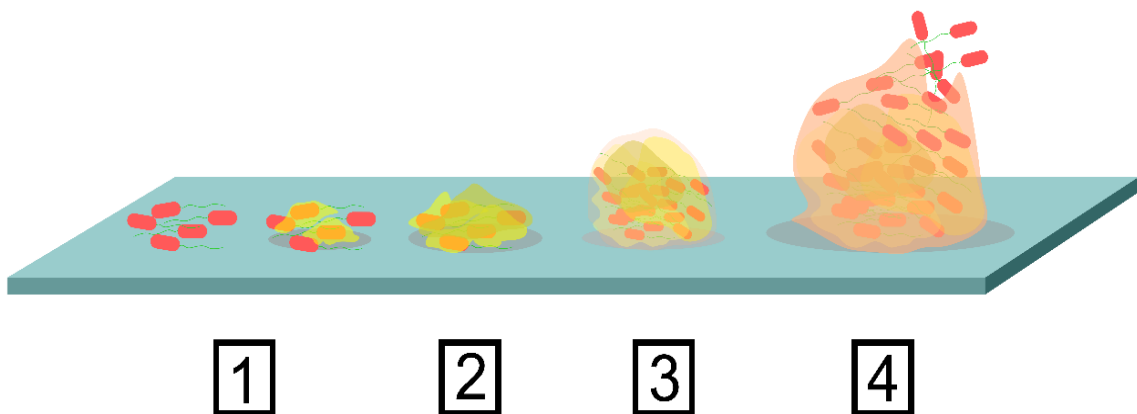
A aderência à superfície envolve dois estágios. O primeiro (etapa 1) é conhecido como adesão reversível, o qual se caracteriza por uma interação inicialmente fraca entre o MO e o material, neste momento a remoção das bactérias ainda pode ser executada (GARRETT et al., 2008). O segundo estágio (etapa 2), a adesão irreversível, está envolvido com a fixação de pili, flagelos, adesinas ou ainda produção de substâncias poliméricas extracelulares, promovendo assim o fortalecimento da ligação entre MOs e a superfície (MONROE, 2007).

A formação segue com uma terceira etapa caracterizada pelo crescimento e divisão celular mediante a presença de nutrientes, com síntese e excreção de EPS, servindo como um ligante para colonizadores secundários. A fixação de outros MOs e substâncias flutuantes permite o crescimento significativo do biofilme, conduzindo assim a sua maturação. Além disso, a produção e adsorção de moléculas presentes na matriz de EPS permitem o crescimento e também favorecem a formação de um biofilme maduro. A quarta e última etapa corresponde à liberação ou desprendimento da massa bacteriana e os MOs liberados estão aptos a colonizar outras superfícies promovendo novas contaminações (CLONTS, 2008).

O desprendimento bacteriano pode promover a disseminação de bactérias patogênicas. Este ocorre por mecanismos que envolvem: descamação, caracterizado por perda aleatória de grandes frações do biofilme; erosão, que corresponde à perda contínua de células individuais e abrasão, uma perda decorrente de uma colisão de

partículas. Além disso, a ação de enzimas com capacidade degradante, respostas fenotípicas mediadas por moléculas sinalizadoras, também contribuem para esta etapa, o que caracteriza o fenômeno conhecido como *quorum sensing* (DERLON, et al., 2008; LI; TIAN, 2012). A **Figura 3** apresenta um esquema das etapas de formação do biofilme bacteriano.

Figura 3: Etapas da formação do Biofilme bacteriano.



Legenda 1: adesão reversível, com possível remoção bacteriana; 2: etapa irreversível com fixação do MO; 3: etapa de divisão celular e excreção do EPS e 4: liberação de células aptas a colonizarem novas superfícies. Fonte: Adaptado de MONROE, 2007.

Além dos mecanismos de resistência bacterianos conhecidos, o que inclui a transferência de genes de resistência e as mutações naturais evolutivas, outros foram descritos para explicar a maior resistência apresentada por cepas produtoras de biofilmes, como a deficiência na penetração e propagação dos antibióticos por meio da matriz exopolissacarídica estável; adsorção dos antimicrobianos na matriz; população bacteriana densa e proximidade entre elas (SMITH, 2005); melhor adaptação fisiológica das bactérias à heterogeneidade química presente nos biofilmes; aumento da expressão de bombas de efluxo (SOTO, 2013), bem como o tempo de formação do biofilme (DONLAN; COSTERTON, 2002). Desta forma, os biofilmes produzidos por espécies bacterianas configuram um importante problema no quadro da resistência bacteriana.

2.4. USO DE ANTIFÚNGICOS NO TRATAMENTO DAS INFECÇÕES FÚNGICAS

Assim como as bactérias, os fungos são MOs responsáveis por provocarem uma diversidade de infecções que podem variar desde quadros cutâneos até

infecções sistêmicas. Os fungos podem se apresentar em uma morfologia variável, sendo classificados em filamentosos, leveduriformes e dimórficos (HÖFLING-LIMA et al., 2005).

No que diz respeito ao tratamento das infecções provocadas por esses MOs, diferentemente do desenvolvimento dos fármacos antibacterianos, os antifúngicos surgiram frente a limitações, retardando assim as suas descobertas. O fato se deve as características biológicas da célula fúngica, que por se tratar de um organismo eucarioto, assim como as células humanas e animais, tornaram-se substâncias com ações deletérias frente ao hospedeiro, resultando em efeitos adversos graves. O iodeto de potássio configurou-se, em meados de 1903, como uma das primeiras drogas de escolha no tratamento de infecções fúngicas, embora apresentasse pouca especificidade. Apesar das dificuldades de se desenvolver uma substância com ações seletivas, é notória a busca por opções antifúngicas que exerçam efeitos específicos, bem como diminuam os efeitos colaterais provocados ao hospedeiro (SIDRIM, 2004).

Neste sentido, muitos fármacos antifúngicos foram desenvolvidos ao longo do tempo. A griseofulvina surgiu em 1939, tornando-se reconhecida clinicamente em 1958 por desempenhar um efeito eficaz frente a lesões dermatofíticas *in vivo*. Esse fármaco ainda é uma opção de escolha no tratamento desse tipo de infecção. As infecções provocadas por leveduras do Gênero *Candida* sp. tiveram como opções terapêuticas os derivados poliênicos, com a descoberta da nistatina em 1951. Contudo, a anfotericina B, em 1956, revolucionou o tratamento de infecções profundas servindo como importante alternativa. Não diferente, o benzimidazol impulsionou a descoberta de derivados azólicos com atividade antimicótica (DERESINSKI; STEVENS, 2003; SCORZONI et al., 2017).

De acordo com Sidrim (2004), os principais fármacos utilizados na terapia antifúngica são divididas em duas categorias: os derivados poliênicos, originados a partir de MOs, e ainda os de origem química. Entre os primeiros, a nistatina e a anfotericina B, são os principais exemplos. Dentre os agentes químicos, substâncias como iodeto de potássio, os derivados azólicos e as equinocandias, encontram-se como exemplos importantes de drogas antifúngicas. As ações desempenhadas por essas substâncias são bastante variáveis, tendo como alvos diferentes estruturas celulares. A anfotericina B, por exemplo, exerce seu efeito fungicida por atuar ligando-se ao ergosterol presente na membrana celular fúngica, e desta forma altera a permeabilidade desta estrutura induzindo a perda do conteúdo celular (LEWIS, 2011;

NETT; ANDES, 2015; SCORZONI et al., 2017). Entretanto, os efeitos adversos apresentados por este fármaco são graves, sendo a nefrotoxicidade o principal exemplo (RANG; DALE, 2011).

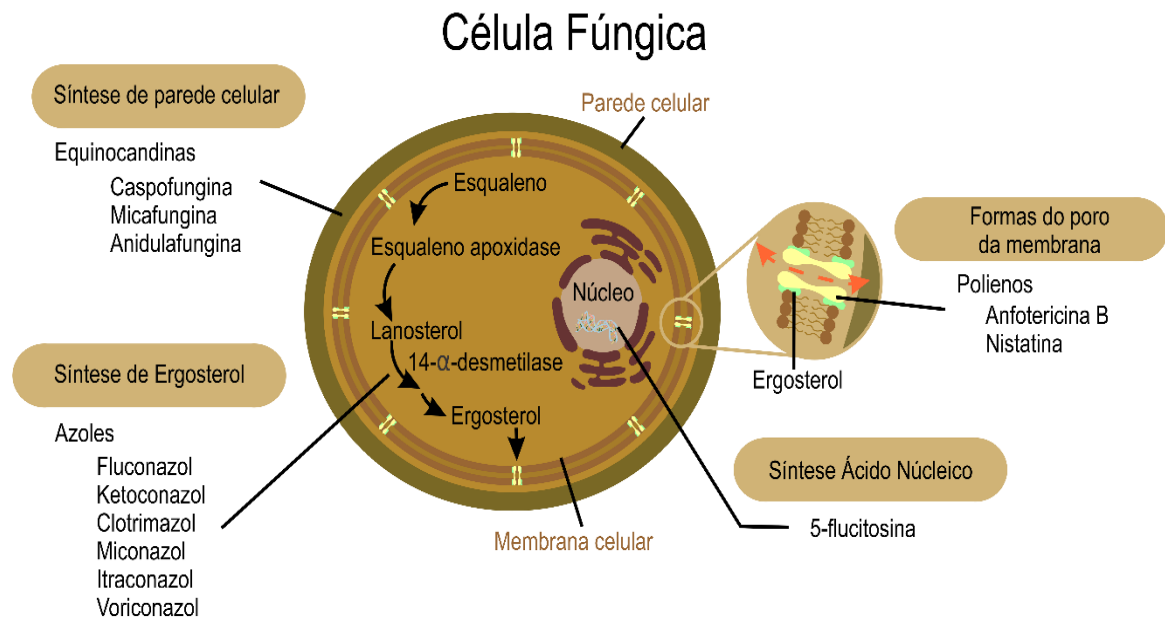
O complexo citocromo P-450 tem uma importante participação na síntese do ergosterol, principal lipídeo componente da membrana celular fúngica. Os derivados azólicos por sua vez atuam bloqueando a enzima lanosterol 14- α -demetilase presente nesta estrutura, e desta forma inibem a demetilação do precursor lanosterol em ergosterol. Assim, a permeabilidade é alterada, comprometendo a viabilidade celular. Além desse efeito, essa classe de fármacos também atua frente à síntese de lipídeos na célula fúngica (LEWIS, 2011; NETT; ANDES, 2015).

Diferente dos derivados azólicos e da anfotericina B, a ação desempenhada pelas equinocandinas, representada principalmente pela caspofungina, ocorre a nível de parede celular fúngica. Essas substâncias agem bloqueando a síntese da beta-(1,3)-D-glucana, principal componente desta estrutura. Como resultado disso, um desequilíbrio osmótico é responsável por inviabilizar a célula, tendo assim um efeito fungicida (DERESINSKI; STEVENS, 2003; SCORZONI et al., 2017).

Um outro alvo importante é a molécula de DNA. Uma pirimidina fluorada sintética, a flucitosina, utilizada em combinação com a anfotericina B, é empregada de maneira restrita a infecções provocadas por espécies de *Cryptococcus neoformans* e *Candida* sp. Por meio de uma citosina-permase específica, a citosina-desaminase, ocorre a penetração da flucitosina na célula fúngica, sendo esta convertida em 5-fluorouracil, o qual bloqueia a enzima timidilato-sintetase e conseqüentemente, a síntese de DNA (SIDRIM, 2004; SCORZONI et al., 2017).

A **Figura 4** apresenta um esquema dos principais alvos celulares dos fármacos antifúngicos.

Figura 4: Alvos celulares dos principais antifúngicos.



Fonte: Adaptado de LE et al., 2015.

Por resultarem em efeitos importantes no tratamento de diversas infecções, os antifúngicos representam substâncias promissoras na garantia da sobrevivência dos pacientes acometidos (NETT; ANDES, 2015). Entretanto, alguns processos infecciosos, a exemplo das dermatofitoses, têm sido associados a quadros de recidivas após interrupções da terapia (MUKHERJEE et al., 2003); apresentando assim uma íntima relação com quadros de resistência aos fármacos empregados, além do uso excessivo de tais substâncias (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). Assim, como as bactérias, fica evidente que os fungos também se tornaram MOs expostos à uma pressão seletiva que contribui significativamente para o surgimento e propagação do problema da resistência microbiana.

2.5. RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

Como todo e qualquer fármaco destinado a terapia de um processo patológico, o desenvolvimento de importantes antifúngicos contribuiu expressivamente para o aumento da expectativa de vida pós-infecção. No entanto, o aparecimento de resistência por esses MOs despertou preocupação aos mais diversos profissionais de saúde, devido ao aumento da gravidade das infecções, além dos custos com medicamentos e tempo de internação (PERES et al., 2010).

De maneira semelhante aos MOs procariotos, os fungos apresentam um perfil de resistência variável conforme a origem desta característica, podendo esta ser de origem intrínseca ou adquirida. A primeira está relacionada com a capacidade que uma determinada espécie apresenta para tolerar as ações de um medicamento, considerando para isso características específicas decorrentes do processo evolutivo. Por outro lado, a adquirida se dá a partir do surgimento de cepas resistentes em meio a uma população previamente sensível, quando exposta a condições específicas (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008).

Algumas características clínicas têm sido associadas à resistência apresentada por espécies do gênero *Candida* sp. A capacidade de resistir aos efeitos dos antifúngicos *in vivo* por este micro-organismo pode ser decorrente da baixa concentração destas substâncias nos tecidos e/ou sangue, resultante tanto de interações entre fármacos como também pelo comprometimento do sistema imune do paciente. Além disso, a resistência *in vitro* também tem sido descrita como consequência de uma seleção de cepas previamente expostas a tais compostos (DEMITTO et al, 2012).

A literatura tem relatado a ocorrência de isolados resistentes aos mais diversos antifúngicos e um exemplo importante é o fluconazol. Este fármaco apresenta um efeito considerável contra as espécies de *Cryptococcus neoformans* e isolados de *Candida* sp. Entretanto, cepas de *Candida* não *albicans* já foram identificadas resistindo à ação desta droga (COLOMBO et al., 2002). Em 2003, uma cepa de *Trichophyton rubrum* foi isolada de um paciente com onicomicose, apresentando resistência a terapia oral com terbinafina, uma das opções de escolha para o tratamento de dermatofitoses (MUKHERJEE et al., 2003).

A contribuição da utilização inapropriada destas substâncias é expressiva e da mesma forma como as bactérias, os fungos resistem às drogas de escolha por meio de mecanismos específicos e ao mesmo tempo semelhantes aos das células procariotas, conferindo-lhes proteção contra a tais agentes (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008). Dentre as principais ações apresentadas pelos fungos nessa proteção, a diminuição na absorção do conteúdo do fármaco, alvos celulares estruturalmente modificados, alteração no metabolismo da droga pela célula fúngica e o aumento no efluxo da mesma, o que reflete em uma diminuição dos seus níveis intracelularmente, estão entre as mais relatadas (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; PERES et al., 2010; SCORZONI et al., 2017).

Tais mecanismos estão diretamente relacionados com alterações moleculares que envolvem a transferência, amplificação e deleção de genes, bem como mutações de ponto e perda de componentes regulatórios (SCORZONI et al., 2017). Cabe ressaltar que a resistência pode ser originada a partir de mais de um mecanismo, onde mediante determinadas circunstâncias, estes podem ser ativados de forma simultânea conferindo assim tal propriedade (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008).

Como explicação para alguns achados, uma alteração na enzima 14- α -demetilase bem como aumento do efluxo de compostos azólicos foram propostos como mecanismos envolvidos na resistência apresentada por cepas de *Candida* não *albicans* a estas substâncias, justificando assim a ocorrência deste feito. Enquanto um importante agente causador das dermatofitoses, a resistência de cepas de *T. rubrum* aos mais diversos agentes inibidores por diferentes mecanismos, tem sido associada a um aumento do efluxo da droga, a modificação enzimática promovida por mutações, a uma superexpressão de enzimas envolvidas na degradação do fármaco e ainda a uma adaptação ao estresse, configurada como uma resposta inespecífica aos efeitos do mesmo (MARTINEZ-ROSSI et al., 2008; SCORZONI et al., 2017).

A **Tabela 2** apresenta alguns exemplos de antifúngicos e os mecanismos de resistência associados.

Tabela 2: Mecanismos de resistência aos principais antifúngicos.

CLASSE DE ANTIFÚNGICOS	MECANISMO DE RESISTÊNCIA	EXEMPLOS
Derivados azólicos	Aumento na expressão dos transportadores envolvidos no efluxo de drogas Mutações pontuais e aumento na expressão do gene <i>erg11</i> .	Fluconazol, Itraconazol, Miconazol, Voriconazol
Derivados poliênicos	Mutações nos genes <i>erg3</i> e <i>erg6</i> levando a diminuição do conteúdo do ergosterol na membrana	Anfotericina B, Nistatina
Equinocandinas	Mutações pontuais nos genes <i>fks</i> , levando à diminuição a atividade enzimática.	Caspofungina, Anidulafungina, Micafungina

Fonte: adaptada de PRASAD; BANERJEE; SHAH, 2017.

Desse modo, torna-se evidente que a ocorrência de infecções provocadas por cepas fúngicas resistentes refletem em maiores dificuldades ao tratamento e que a ausência de opções terapêuticas eficazes eleva as chances de óbito dos pacientes, bem como implica em maiores gastos em saúde.

2.6. REFLEXO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA SAÚDE PÚBLICA

Considerando que a resistência antimicrobiana surge da união de fatores inevitáveis, como o processo evolutivo dos MOs, e evitáveis, quanto do uso indiscriminado de fármacos, o problema configura-se como algo irreversível. Diversos estudos já apresentaram em números o reflexo deste problema, demonstrando assim que a ocorrência deste fato se encontra presente em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, tornando-se um problema de saúde pública mundial, emergindo em hospitais e na comunidade (FAIR; TOR, 2014; PRESTINACI et al., 2015).

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), termo designado àquelas infecções que ocorrem no hospital, são provocadas em sua maioria por MOs resistentes a um ou mais antibióticos, gerando preocupação na área médica pelas altas taxas de mortalidade decorrentes deste quadro (FRIEDMAN et al., 2016). Dada a gravidade e dispersão da situação, os números de infecções no ambiente hospitalar por MOs resistentes são expressivos nas mais diversas regiões do mundo, refletindo assim a disseminação do problema. No Brasil, diversos trabalhos demonstram tais dados, o que evidencia essa prevalência no país.

Em um estudo realizado a fim de identificar o perfil microbiológico das infecções ocorridas na UTI de um hospital em Campo dos Goytacazes – RJ, no ano de 2008, os autores constataram 26 casos de IRAS. A espécie bacteriana *Proteus mirabilis* foi identificada como a mais prevalente nestas infecções (PADRÃO et al., 2010). Ferrareze et al (2007) avaliando por um ano a prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente na UTI de um hospital de urgências, constatou a ocorrência de 68 casos de infecção hospitalar provocada por cepas multirresistentes, sendo 10 destes associados à espécie investigada.

Andrade et al. (2006) observou a presença de diversas espécies bacterianas multirresistentes em pacientes no Centro de Terapia Intensiva de um hospital brasileiro. De um total de 68 pacientes portadores de espécies resistentes à mais de um antibiótico, isolados de *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, *S. aureus*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, mostraram-se mais prevalentes.

No estudo de Guimarães et al. (2011), ao investigarem o número de óbitos associados à infecção hospitalar entre os anos de 2007 e 2008 em um hospital público, os autores verificaram que de um total de 812 mortes, 133 delas foram provocadas por infecções adquiridas na instituição, sendo que em 110 casos a identificação do agente etiológico causador da infecção foi obtida a partir de 241 culturas realizadas. Nestas, constatou-se que em alguns casos a presença de até quatro agentes etiológicos em um mesmo processo infeccioso foi associada ao óbito.

Ainda no levantamento de Guimarães et al. (2011), observou-se uma maior frequência de bactérias Gram negativas responsáveis por tais infecções, sendo a espécie *P. aeruginosa* identificada em 24, do total de culturas realizadas. Além destas, nove cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina também foram isoladas. Por fim, certificou-se que dos 241 diagnósticos, 96 agentes etiológicos apresentavam um perfil de multirresistência, o que demonstra a íntima relação entre MOs resistentes e a elevada taxa de mortalidade em hospitais.

Da mesma forma como as infecções bacterianas, notadamente tidas como as de maior ocorrência no hospital, as infecções fúngicas são responsáveis por 12% das infecções hospitalares. Neste sentido, a utilização prévia de antibióticos, ventilação mecânica, imunossupressão, quimioterapia e uso de equipamentos invasivos, entre outros, são considerados fatores relacionados ao surgimento destes quadros (DIGNANI et al., 2003; GABARDI et al., 2016). As leveduras, em especial espécies do gênero *Candida* sp, estão entre as mais associadas, sendo muitas delas encontradas em quadros de infecções urinárias (MOREIRA, 2017; GABARDI et al., 2016).

No trabalho de Demitto et al. (2012), os autores avaliaram a susceptibilidade antifúngica de isolados obtidos do Hospital Universitário Regional de Maringá, no ano de 2010. As amostras foram oriundas de diferentes sítios, em quadros de IRAS comprovada. Tanto isolados de *C. albicans* quanto de *Candida* não *albicans* foram submetidos ao ensaio. Os resultados demonstraram cepas de *C. glabrata* e *C. krusei* resistentes a importantes antifúngicos, como o Itraconazol e Fluconazol, respectivamente.

Hinrichsen et al. (2008), investigando em um hospital privado a ocorrência de candidemia, quadro de infecção fúngica que acomete a corrente sanguínea, constataram 21 casos desse tipo de infecção, em um período de seis meses. A análise do perfil microbiológico apresentou isolados de *C. parapsilosis* e *C. albicans* como as espécies fúngicas mais prevalentes. Além destas, outras espécies de *Candida* sp.

também foram identificadas, incluindo: *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*. Ao analisar as condições associadas ao quadro, observaram que a utilização prévia de antibióticos foi um dos fatores mais correlacionados à infecção, demonstrando assim a preocupação com o uso indiscriminado de agentes inibidores e sua contribuição para aquisição de infecções dentro do ambiente hospitalar.

A análise do perfil de sensibilidade antifúngica de isolados de *Candida* sp. em uroculturas, provenientes do laboratório de um hospital particular na cidade de São José dos Campos – SP, demonstrou a ocorrência de uma elevada incidência de resistência. De 123 uroculturas investigadas, 18 delas foram positivas para o isolamento de *Candida* sp., das quais 50,77% apresentaram resistência aos antifúngicos testados, sendo o maior percentual observado frente aos agentes azólicos, cerca de 29,36% (MOREIRA, 2017).

Diante do uso indiscriminado dos antimicrobianos e a capacidade dos MOs evoluírem com o desenvolvimento dos mais diversificados mecanismos de resistência, até 2050 estima-se o óbito de 10 milhões de pessoas, em decorrência da resistência antimicrobiana, sendo esta prevalência até mesmo maior que o câncer (O'NEILL, 2016). A diversidade de estudos que apresentam a incidência de MOs resistentes aos principais antimicrobianos demonstram claramente o problema da resistência microbiana em um contexto de saúde pública, evidenciando assim a preocupação e necessidade da busca por novos compostos que sirvam como substâncias promissoras para o tratamento de quadros infecciosos provocados por tais agentes.

2.7. AS PLANTAS MEDICINAIS E SEUS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Há bastante tempo a utilização de plantas medicinais é uma atividade presente no contexto médico-social. O fato representa um marco historicamente importante no desenvolvimento de muitas nações, promovendo melhorias e a cura de muitas enfermidades. O emprego de plantas medicinais tem sido comum em regiões como Ásia, África e América Latina, cuja aplicação está relacionada com a conhecida medicina popular, sendo uma alternativa para solucionar diversos problemas de saúde. Desta forma, a prática serve de base para a Farmacologia moderna, representando uma fonte inesgotável de recursos potencialmente terapêuticos (ZAGO et al., 2009; ROZATTO, 2012).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as plantas medicinais podem ser definidas como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais

órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. O Brasil possui a maior biodiversidade de plantas de todo o mundo, aproximadamente mais de 20% do número total de espécies do planeta. Essa importante presença na diversidade brasileira tem sido aceita tendo por base o conhecimento tradicional das suas utilizações (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; CARVALHO et al, 2007).

A finalidade desses produtos na pesquisa farmacológica tem por objetivo em comum: a identificação de suas ações biológicas, a caracterização química, bem como explicações para os efeitos observados na comunidade (SIXEL; PECINALLI, 2005). Ainda neste sentido, características etnofarmacológicas devem ser destacadas no estudo de tais produtos, considerando-se para isso as particularidades do seu uso na medicina popular, respeitando aspectos culturais envolvidos no contexto social de uma população. Muitos extratos preparados a partir de plantas usadas tradicionalmente são avaliados quanto a seus efeitos através de metodologias avançadas capazes de explicar os resultados significativos obtidos. Assim, essa contribuição tem suma importância no processo construtivo de novos fármacos (NAZ et al., 2017).

A pesquisa com produtos naturais extraídos de plantas medicinais tem contribuído de maneira expressiva para o desenvolvimento de fitoterápicos confiáveis e seguros, no entanto considera-se que mais estudos devam ser realizados para comprovarem o uso seguro e eficaz desses componentes (VIEIRA et. al., 2010). Muitas espécies de plantas medicinais servem como fonte de constituintes bioativos consideráveis, que desempenham um papel crucial nos estudos que envolvem a criação de novos fármacos, visando o tratamento dos mais diversos problemas de saúde (SIVASANKAR et al., 2017). Tais compostos sintetizados durante o metabolismo vegetal apresentam diversas propriedades biológicas, sendo assim foco de muitos estudos (SCHELZ; HOHMANN, 2006).

Atualmente, muitas atividades biológicas já foram descritas para as mais variadas espécies de plantas medicinais. Dentre as principais atividades, destacam-se: atividade antioxidante, antiulcerativa, nefroprotetora (ANANTH et al., 2018), anti-inflamatória (OGUNTIBEJU, 2018), antihelmíntica, citotóxica (KASKA et al., 2018), gastroprotetora (LIMA et al., 2013), anti-inflamatória intestinal (LIMA et al., 2017), bem como os efeitos antibacteriano, antibiofilme (ARAUJO et al., 2015) e antifúngica (ARAUJO et al., 2019), dentre outras.

As plantas medicinais apresentam um metabolismo responsável pela formação de compostos oriundos de reações químicas específicas, os chamados metabólitos (VON POSER; MENTZ, 2003). Estes podem ser classificados em metabólitos primários, considerados importantes pela produção de componentes essenciais ao desenvolvimento e crescimento do organismo (DEMAIN, 2000) e ainda em metabólitos secundários, responsáveis por garantir a manutenção da interação entre o organismo e o ambiente, além de caracterizarem um processo de diferenciação e especialização celular (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011).

Apesar de não terem suas funções fisiológicas completamente definidas, acredita-se que a produção destes compostos esteja sujeita a um mecanismo de defesa contra o ataque de herbívoros e patógenos (FERRO, 2006). Todos eles podem ser encontrados em diversos tecidos e órgãos das plantas ou até mesmo se apresentarem em um único órgão correspondendo assim a uma complexa estrutura rica em componentes importantes (SILVA JÚNIOR, 2003). A região geográfica, o clima, a temperatura, tipo de solo, disponibilidade de nutrientes e umidade, estão entre fatores que podem influenciar na concentração e distribuição destes compostos nas plantas (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010).

Muitos deles, por possuírem uma interação com organismos e o ambiente, são considerados como responsáveis por muitas atividades biológicas apresentadas por plantas medicinais, e desta forma servem como moléculas de grande utilidade na área farmacológica (ARAÚJO, 2011). Esse metabolismo secundário dá origem a diversificados grupos de compostos que entre os principais encontram-se os flavonoides, bioflavonoides, alcaloides, taninos e glicosídeos terpenoides, em que a presença destes pode variar de acordo com a família, gênero e espécie da planta. Além da proteção já mencionada, alguns deles são responsáveis, por exemplo, pelo odor, pigmentos e sabor característico (AHMED et al., 2017).

Muitas atividades biológicas já foram atribuídas a vários destes metabólitos secundários. A exemplo disso, os flavonoides, que representam os grupos fenólicos de grande importância e diversidade entre as moléculas vegetais, já demonstraram efeitos anti-inflamatórios, antioxidante, antitumoral, além de antimicrobiano, demonstrado pelas catequinas, que integram os compostos desta classe (GARCIA-LAFUENTE et al., 2009). Outros constituintes como os terpenos, que apresentam uma ampla variedade estrutural em suas moléculas, também são responsáveis por atividades importantes na defesa contra bactérias, fungos, alguns herbívoros, além de

efeitos antimalárico e antiviral (OLIVEIRA, 2003; CHATURVEDI, 2011). A riqueza da biodiversidade brasileira não se restringe apenas às diversas opções de produtos naturais disponíveis, mas também se caracteriza por uma grande e infinita riqueza de moléculas oriundas destes a qual é considerada superior àquela produzida sinteticamente (ARAÚJO, 2011).

Desta forma, pelo surgimento de MOs mutantes que escapam das ações das principais drogas de escolha, diminuindo assim as alternativas disponíveis, e pelos efeitos positivos demonstrados por muitas espécies de plantas e/ou produtos isolados destas em ensaios com atividade antimicrobiana, intensifica-se a busca na medicina popular por moléculas candidatas ao desenvolvimento de novas opções terapêuticas capazes de vencer a resistência apresentada pelos MOs (DIAZ et al., 2010; SILVA, 2010).

2.8. QUINONAS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Diversos produtos obtidos a partir de plantas medicinais demonstraram efeitos consideráveis frente à muitos problemas de saúde, incluindo as doenças infecciosas. Entretanto, a falta de evidências científicas instiga pesquisas que possam explicar a eficácia destes produtos na medicina popular (LIMA, et al., 2006).

As atividades biológicas de óleos essenciais e extratos oriundos de muitas espécies vegetais, por exemplo, apresentam resultados significativos em modelos de estudos *in vitro* e *in vivo*. Assim, as observações obtidas potencializam a investigação com compostos isolados e, com o problema da resistência antimicrobiana, a aquisição de moléculas que demonstrem potenciais antimicrobianos torna-se de grande interesse científico, tendo por finalidade o desenvolvimento de novos agentes inibidores (DUARTE et al., 2005; CASTILHO et al., 2014).

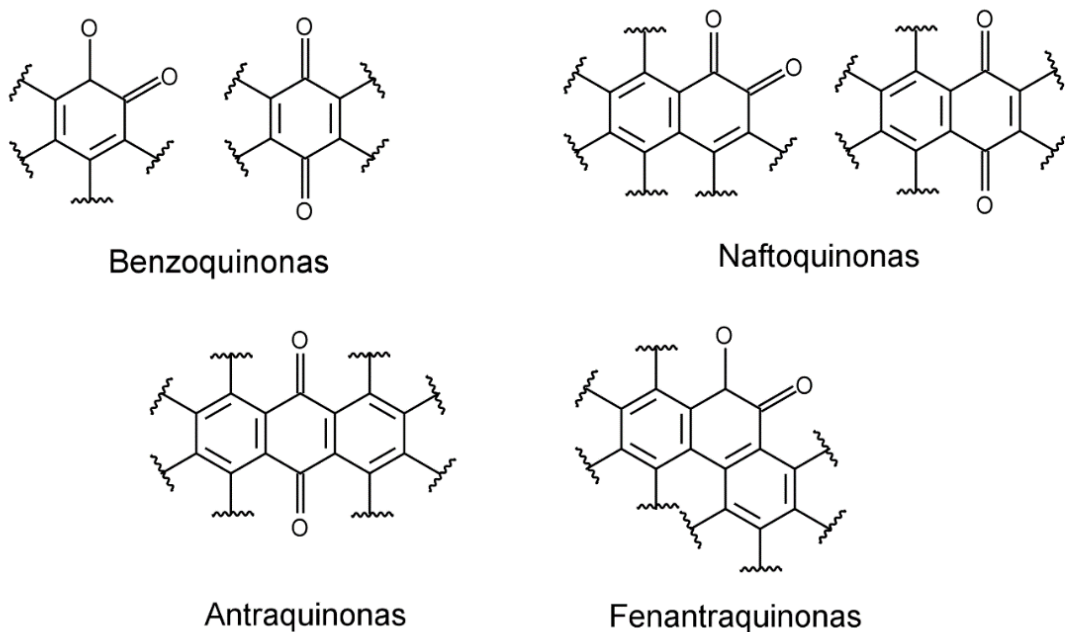
As quinonas são um exemplo clássico de moléculas isoladas a partir de produtos naturais. Estas são metabólitos secundários de plantas, fungos, bactérias e insetos, e correspondem à uma interessante classe química encontrada de forma ubíqua na natureza. A participação destes compostos no desenvolvimento dos seus precursores está associada à cadeia transportadora de elétrons na respiração celular e ainda à fotossíntese (MONKS et al., 1992).

Estruturalmente, tais substâncias apresentam-se como moléculas cíclicas conjugadas, originadas a partir de compostos aromáticos pela conversão de grupamentos hidrocarbonetos (CH=) em dois grupamentos carbonilas (C=O), sendo

ainda consideradas responsáveis pela proteção à patógenos e pela coloração apresentada por seus precursores (MADEO et al., 2013; DE LUCAS et al., 2014). Por possuir essa propriedade de coloração, historicamente, essas moléculas despertaram interesses na área química e farmacêutica, onde o isolamento e identificação desses pigmentos com atividades biológicas, serviram como base para exploração de muitas quinonas naturais na utilização como corantes e medicamentos (BAYEN et al., 2007).

A variação estrutural das quinonas implica diretamente em sua classificação. Quando da ocorrência de duas carbonilas adjacentes a molécula é denominada como 1,2-quinonas ou *orto*-quinonas. Se as carbonilas se apresentarem separadas por dois átomos de carbono, a molécula recebe a nomenclatura de 1,4-quinona ou *para*-quinonas (DE LUCAS et al., 2014). A classificação pode ser baseada ainda de acordo com a estrutura química do sistema aromático principal. Desta maneira, a quinona é tida como benzoquinona, quando esta é derivada de um benzeno; de naftoquinona, quando derivada de naftaleno; de antraquinona, se derivada de um antraceno e fenantraquinonas, se derivada de anel fenantrênico (**Figura 5**) (SOUSA, 2012; DE LUCAS et al., 2014).

Figura 5: Classificação das quinonas de acordo com o sistema aromático principal.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Por suas contribuições irreversíveis no transporte de elétrons, em processos de oxirredução, esta propriedade faz das quinonas moléculas amplamente conhecidas (MALTA, 2000; MADEO et al., 2013) e tal característica tem sido associada com atividades biológicas importantes, demonstrando efeitos terapêuticos e toxicológicos (BAYEN et al., 2007). De acordo com Monkes e Jones (2002), as atividades apresentadas por essas substâncias estão diretamente relacionadas com suas estruturas, as quais exercem influência sob o efeito observado. Ainda segundo os autores, os seres humanos estão expostos à essa classe química por meio de três condições, que incluem a dieta, a utilização de medicamentos e a poluição atmosférica.

Segundo Madeo et al (2013), as características hidrofóbicas das quinonas permitem interações com proteínas e membranas celulares. Para que se tornem estáveis e sejam biologicamente ativas, precisam ser reduzidas e desta maneira funcionam como moléculas aceptoras de um e/ou dois elétrons (ciclo redox), resultando na formação, *in situ*, do ânion radical ou diânion correspondentes (SALMON-CHEMIN et al., 2001). Estes por sua vez participam de processos celulares importantes ou em outros casos, geram danos à molécula de DNA e proteínas, controlando desta forma as atividades biológicas apresentadas (O'BRIEN, 1991).

A literatura reporta os primeiros relatos de ocorrência das quinonas. Fieser & Fieser (1956) descreveram a primeira síntese de uma benzoquinona a partir de uma reação de oxidação entre ácido quínico, dióxido de manganês e ácido sulfúrico, no final de 1830. O'brien (1991) traz que em 1950 estabeleceram-se os estudos sobre as propriedades antibióticas de pigmentos produzidos por fungos e que estas foram então associadas às quinonas. No final da mesma década, a mitomicina C, um antibiótico isolado, demonstrou um efeito antitumoral considerável. Posteriormente, em 1963, o isolamento da daunorrobicina, uma antraquinona glicosídica garantiu um efeito antileucêmico significativo à essa molécula. Em 1969, a doxorrobicina mostrou-se mais eficaz que daunorrobicina, apresentando efeitos contra diversos tipos de tumores (O'BRIEN, 1991).

Dentre as classes de quinonas abundantemente presentes na natureza e que servem como moléculas chave no desenvolvimento de compostos biologicamente ativos, as benzoquinonas destacam-se por terem seus efeitos comprovados cientificamente (ABRAHAM et al., 2011). Os promissores efeitos, farmacológico e/ou toxicológico, apresentados pelas benzoquinonas e/ou dos seus derivados, as tornam

alvos de muitos estudos e na literatura relatos da sua utilização refletem esta conduta. De acordo com o levantamento de Sbardelotto (2013), os estudos iniciais com benzoquinonas visaram a investigação de suas propriedades antibacteriana e anticoagulante. Ainda segundo o autor, estudos com a investigação pelo potencial anticâncer destas moléculas tem crescido consideravelmente nos últimos anos (SBARDELOTTO, 2013).

Diversos achados reforçam o potencial terapêutico das para-benzoquinonas frente a diversos modelos de estudos e investigações científicas. Como exemplo, o trabalho de Mostert et al. (2017) que demonstrou a inibição de monoaminas oxidases (MOA) humanas por moléculas desta classe. As enzimas MOA estão envolvidas na degradação de importantes aminas neurotransmissoras, como a serotonina. Estas podem se apresentar em duas isoformas: MAO-A e MAO-B. Inibidores da MOA são considerados de grande interesse clínico quando da sua aplicação em distúrbios depressivos decorrente do acúmulo destas enzimas.

Dada a problemática da resistência microbiana, muitos estudos têm como foco a investigação da atividade antibacteriana e antifúngica das benzoquinonas e/ou dos seus derivados. A exemplo disso, Jin & Sato (2003) identificaram uma benzoquinona (2,5-ciclohexadieno-1,4-diona) como a molécula essencial para a atividade antibacteriana apresentada pelo extrato da pêra *Pyrus* sp. Os autores chegaram a esta conclusão após estudos de isolamento da molécula por análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Drewes et al. (2005) descreveram o isolamento de uma benzoquinona (2-metil-6-[3-metil-2-butenil] 1,4-benzoquinona) extraída de *Gunnera perperna* com uma expressiva atividade antibacteriana contra *S. epidermidis* ATCC 12228. Outras espécies, incluindo *S. aureus* ATCC 6538, *E. faecalis* ATCC 29212, e *Bacillus cereus* ATCC 11778, também se mostraram sensíveis à ação do composto. Além disso, esta substância também foi capaz de inibir, mesmo em concentrações mais elevadas, o crescimento de leveduras como *C. neoformans* e *C. albicans*.

Pangal et al (2013) também estudaram moléculas desta mesma classe e evidenciaram que tais substâncias apresentaram atividade antibacteriana contra as espécies de *S. aureus* e *E. coli*. Kurban et al (2019) demonstraram que moléculas benzoquinônicas modificadas foram capazes de inibir o crescimento das linhagens *Staphylococcus aureus* 209-P, *Escherichia coli* B-906 e *Mycobacterium luteum* B-917,

bem como das espécies fúngicas *Candida tenuis* VKM Y-70 e *Aspergillus niger* F-1119.

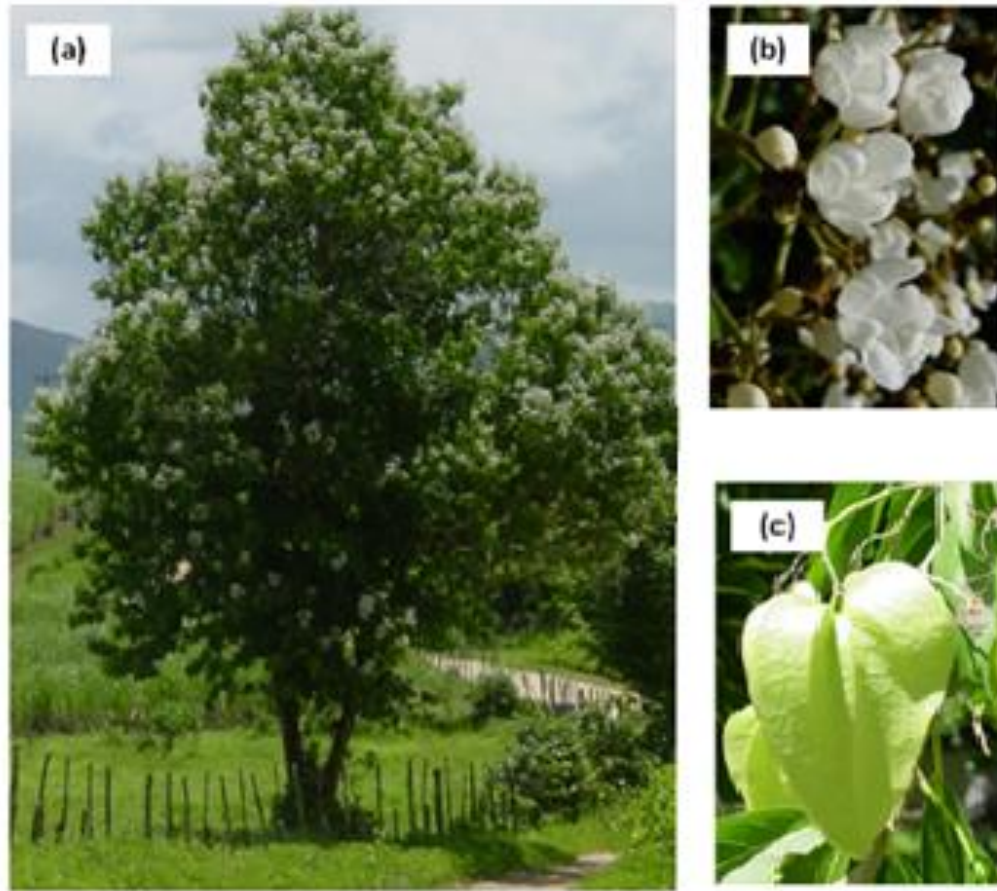
Diante do exposto na literatura, evidencia-se o potencial biológico apresentado pelas quinonas, e em especial as benzoquinonas, é foco de várias pesquisas. Moléculas desta classe, originalmente extraídas de produtos naturais, e as submetidas a modificações químicas, têm demonstrado considerável potencial antimicrobiano. Neste sentido, a busca por novas benzoquinonas de origem natural que apresentem potencial para atividades antibacteriana e/ou antifúngica, torna-se promissora para desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

2.9. ONCOCALIXONA A

2.9.1. Obtenção e caracterização do material

A diversidade de espécies vegetais, incluindo as plantas medicinais, presentes em todo o território brasileiro, faz da utilização destas um comportamento histórico e cultural na medicina popular (RICARDO et al., 2017). No estado do Ceará, Nordeste do Brasil, *Auxemma oncocalyx* Taub é uma espécie endêmica da Caatinga (**Figura 6**). Pertencente à família Boraginaceae, a planta é popularmente conhecida como “pau branco” e sua aplicação na medicina popular se dá pela utilização das cascas do caule com efeito adstringente, para o tratamento de cortes e feridas (BRAGA, 2001). Historicamente, observa-se uma controvérsia em relação à classificação das espécies. Sua localização endêmica na caatinga, originou o gênero "*Auxemma*", palavra que se refere à secura. No entanto, a espécie foi reclassificada taxonomicamente para o gênero ao qual pertencia inicialmente, o gênero *Cordia*, sendo assim também conhecida como *Cordia oncocalyx* (GOTTSCHLING; MILLER, 2006). O β -sitosterol (3 β -O-D-glucopiranosil sitosterol), seu glicosídeo, e alantoína, foram isolados do seu extrato hidroalcolólico e considerados responsáveis pelo uso popular (PESSOA; LEMOS, 1997).

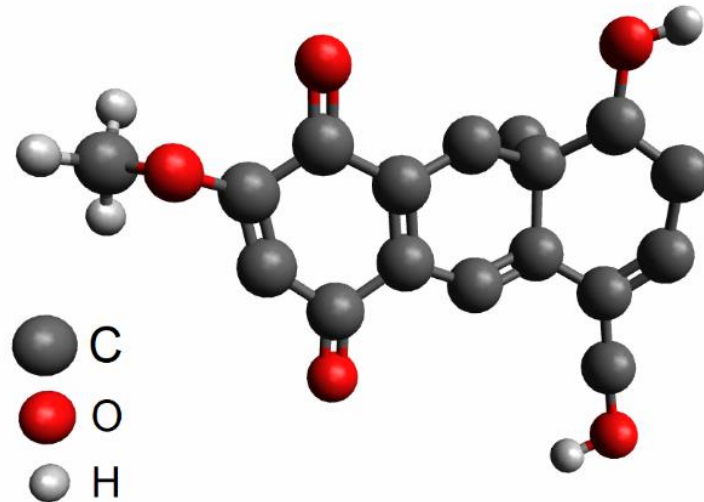
Figura 6: *Auxemma onocalyx* Taub (Boraginaceae).



Legenda: (A) Porte arbóreo da planta; Flores (B); Frutos (C). Fonte: BARRETO et al., 2013.

As investigações químicas a partir do extrato de *A. onocalyx*, preparado com hexano e etanol, permitiram o isolamento de sete quinonas terpenoides. Dentre as principais, uma quinona de coloração vermelha escura, foi obtida em grandes quantidades e denominada de Oncocalixona A (Onco A) [rel-8 α -hidroxi-5-hidroximetil-2-metoxi-8 α , β -metil-7,8,8 α ,9-tetrahidro-1,4-antracenediona] (**Figura 7**). A substância obtida foi submetida à caracterização por diferentes técnicas espectroscópicas, incluindo espectroscopia de absorção na região do UV-VIS, espectrometria de massas, espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN) em sequências 2D. A molécula foi considerada responsável pela coloração do cerne do caule da planta e classificada como uma *para*-benzoquinona (PESSOA et al., 1993; 1995).

Figura 7: Estrutura química de Oncocalixona A (Onco A).



Fonte: Pessoa et al (1993), com adaptações.

2.9.2. Potencial biológico de Oncocalixona A

A utilização de Onco A em modelos de estudos *in vitro* e *in vivo* tem sido descrita na literatura. Entre os primeiros estudos relatados, Pessoa et al. (2000) avaliaram o efeito antiproliferativo/citotóxico de diferentes compostos de plantas do Nordeste do Brasil. Os autores identificaram quatro destes com expressiva atividade, inibindo o crescimento de diferentes linhagens de células humanas, incluindo células leucêmicas (CEM) e tumorais de pulmão, da linhagem SW1573, e ainda fibroblastos normais de pele, da linhagem CCD922. Dentre as quatro moléculas, Onco A destacou-se com atividade frente as linhagens de células utilizadas. O estudo evidenciou uma das primeiras atividades biológicas de Oncocalixona A.

Costa-Lotufo et al. (2002) utilizaram o modelo de desenvolvimento do ovo do ouriço do mar para avaliar o efeito da fração quinona obtida de *A. oncocalyx*, na divisão celular e no desenvolvimento embrionário desta espécie. Este trata-se de um modelo que permite determinar as atividades citotóxica e teratogênica de compostos em estudos. Ao avaliarem os parâmetros de clivagem e a forma embrionária de blástula, o composto mostrou-se tóxico inibindo em 50% o desenvolvimento dos ovos do ouriço do mar, de maneira dependente da concentração. A indução de anormalidades na terceira clivagem e a destruição dos embriões a partir de danos à membrana, bem como o efeito geral observado, foram características atribuídas à presença de Onco A, uma vez que este é o principal constituinte da fração.

Apesar do potencial antitumoral anteriormente descrito e conferido pela sua atividade antimetabólica, os achados obtidos com o estudo de Costa-Lotufo et al. (2002) indagaram a aplicação de Onco A como uma droga com este efeito, tendo em vista que a mesma provocou destruição embrionária em concentrações semelhantes às concentrações testadas com células cancerosas. Contudo, os autores ressaltaram a necessidade da utilização de quinonas que apresentem um potencial antimetabólico, mas com menor citotoxicidade.

Mensurando os níveis de TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica) no plasma, o efeito hepatoprotetor desta molécula foi avaliado por Ferreira et al. (2003) em um modelo de toxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄) em camundongos. Os resultados mostraram que a administração intraperitoneal de uma concentração de 10 mg/mL de Onco A foi capaz de reverter os níveis enzimáticos no modelo estudado e uma inibição mais significativa foi observada para os níveis de TGP, conhecido como um parâmetro específico para análise de lesões no fígado. O efeito observado foi correlacionado com a propriedade antioxidante da quinona estudada, a partir da inibição de radicais livres e peroxidação lipídica (FERREIRA et al., 2003).

Baseado na atividade antitumoral demonstrada anteriormente e considerando o uso de *A. oncocalyx* na medicina popular, a atividade genotóxica de Onco A em comparação com sua atividade citotóxica, também foi analisada em ensaios *in vitro*, frente à cultura de linfócitos humanos. Para isso, os parâmetros de alterações cromossômicas e índice mitótico foram avaliados em diferentes fases do ciclo celular (PESSOA et al., 2003).

O tratamento com a molécula, nas fases G1, G1/S e S, em uma concentração de 0,5 µg/mL indicou que Onco A apresentou uma citotoxicidade semelhante ao controle utilizado (Doxorrubicina a 0,1 µg/mL), com um efeito tóxico menor na fase S. Com o resultado obtido sugeriu-se uma inibição da síntese de DNA, principalmente na fase de transição G1/S. Além disso, a molécula não induziu aberrações cromossômicas expressivas na linhagem de célula testada o que demonstra ausência de genotoxicidade. As informações obtidas por Pessoa et al. (2003) reforçam a aplicação terapêutica deste composto.

Ao estudar a fração quinona obtida do *A. oncocalyx*, Ferreira et al. (2004) demonstraram o potencial anti-inflamatório e analgésico desta. Utilizando doses de 10 e 30 mg/kg com administração intraperitoneal (i.p.) em ratos, a fração reduziu de

maneira significativa o edema de pata induzido por carragenina. No modelo de edema de pata, induzido por dextrano, a dose de 30 mg/kg da substância foi capaz de diminuir o efeito produzido. No teste de contorção abdominal induzida por ácido acético, as doses de 1,0 e 5,0 mg/mL do composto inibiram estas contorções de maneira dose-dependente.

O efeito desta fração na nocicepção induzida por formalina foi também investigado no mesmo estudo em duas fases distintas, sendo estas conhecidas como fase neurogênica e fase inflamatória. De acordo com o modelo utilizado, observou-se uma redução no tempo de lambida da pata na utilização das doses de 5, 10 e 30 mg/kg, administradas por via i.p., sugerindo assim uma resposta envolvida com o processo inflamatório. Em contrapartida, não se evidenciou mudanças no efeito apresentado pela fração na presença do antagonista, se comparada ao efeito da fração sozinha, o que demonstra a não participação do sistema opioide (FERREIRA et al., 2004).

Pessoa et al. (2004) investigaram o efeito inibitório no crescimento celular e a reatividade do DNA de três derivados do Onco A, modificados por reações de cloração e acetilação. Os resultados evidenciaram que duas das três moléculas modificadas testadas, foram menos ativas se comparadas a Onco A sem modificação, contra a linhagem de células leucêmicas. Contudo, ao analisarem os danos à molécula de DNA, os autores observaram que tanto as moléculas modificadas quanto Onco A natural, foram capazes de lesar o DNA na concentração de 5 µg/mL.

Tomando como base o efeito de inibição do crescimento celular e o dano ao DNA, os autores constataram que as moléculas modificadas apresentaram uma menor atividade em comparação com a molécula original, e que isso estava associado com uma diminuição na intercalação com o DNA, que conduziu a um menor dano ao ácido desoxirribonucleico. Além disso, as modificações em posições específicas da molécula, foram responsáveis por inibir essa ligação ao DNA (PESSOA et al., 2004).

Essa interação com a molécula de ácido nucléico foi comprovada por Costa et al. (2012) ao estudarem essa relação em um modelo eletroquímico com biossensores de DNA, que serve como uma alternativa de triagem para estudos de interação molecular, *in vitro*. Utilizando um DNA fita simples (ssDNA), constatou-se que Onco A interage com as bases de Guanina e Adenina. Esse efeito foi evidenciado por uma diminuição dos picos de oxidação destas bases, no modelo de estudo realizado. A análise a nível de nucleotídeo (ácido poliadenílico - Poly A) permitiu determinar a

influência da porção açúcar-fosfato na oxidação e a partir disso, demonstrou-se que na presença desta porção, a interação entre Onco A e Poly A ocorre com alta intensidade, o que evidencia sua ligação com a molécula de DNA.

Os achados obtidos por Ferreira et al. (1999) demonstraram a atividade antiplaquetária da fração aquosa obtida do extrato etanolólico de *A. oncocalyx*. Adicionalmente, o mecanismo envolvido também foi investigado pelos mesmos autores (FERREIRA et al. 2008). Uma vez que Onco A é o principal constituinte da fração estudada anteriormente, o seu efeito nesta atividade foi avaliado em modelos *in vitro*, frente a agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas, incluindo difosfato de adenosina (ADP), colágeno, ácido araquidônico (AA), trombina e ristocetina, em plasma rico em plaquetas (PRP).

Através de um método turbidimétrico, constatou-se que Onco A foi capaz de inibir a agregação plaquetária, respectivamente, com IC₅₀ de 85, 122, 159, 161 e 169 µM para os modelos de trombina, ADP, AA, colágeno e ristocetina. A avaliação dos mecanismos envolvidos evidenciou uma correlação com aumento dos níveis de cGMP (monofosfato de guanosina cíclico), um efeito independente da participação do NO (óxido nítrico) e ainda um bloqueio da glicoproteína (GP) Iba, a qual tem participação ativa no processo de agregação plaquetária. Os achados tornaram Onco A como um forte candidato ao desenvolvimento de fármacos antitrombóticos (FERREIRA et al., 2008).

Estabelecendo uma associação com o potencial antitumoral desta molécula e o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, Barreto et al. (2013) relataram a criação de um sistema de nanopartículas de óxido de ferro (Fe₃O₄) para armazenamento e liberação de Onco A, tendo como alvo a terapia contra o câncer. Pelo método de UV-VIS, a análise do ensaio de liberação evidenciou que nas 10 primeiras horas ocorreu uma rápida liberação do composto, e que este efeito estaria atribuído ao conteúdo da molécula absorvido na superfície do sistema. Em uma simulação de condição fisiológica, com pH 7,4 e temperatura de 37° C, verificou-se uma liberação máxima de Onco A, alcançando cerca de 60% após 72 horas. Os resultados obtidos destacaram o potencial do nanossistema desenvolvido como uma alternativa para terapia do câncer.

No estudo de Melo et al. (2015) a atividade de Onco A como um agente anti-glicação foi proposta. Segundo os autores a glicação corresponde a uma modificação não enzimática decorrente da interação de proteínas com moléculas de açúcar,

configurando-se assim como modificações proteicas pós-traducionais. O resultado deste processo é a formação irreversível dos produtos finais de glicação avançada (AGE, advanced glycation end products). Estes por sua vez interagem com demais proteínas, conduzindo a ações de dano e degradação, caracterizadas por proteínas com estruturas ou funções alteradas.

A partir disso, o potencial anti-glicação da molécula foi investigado em um modelo *in vitro* de glicação induzida por glicose e frutose. Onco A foi capaz de inibir eficientemente a formação de AGE de maneira dependente da concentração, sendo esta significativamente menor se comparada ao controle padrão, a aminoguanidina. O efeito foi atribuído ao potencial antioxidante da molécula, uma vez que a inibição de EROs (espécies reativas de oxigênio) está associada aos mecanismos envolvidos na atividade de agentes anti-glicação. Os achados reforçaram a viabilidade desta molécula no tratamento de complicações associadas ao excesso de AGE (MELO et al., 2015).

Considerando a importância de se determinar o potencial benéfico e/ou tóxicos de novos compostos, Leiva-Revilla et al. (2016) utilizaram um modelo de estudo *in vitro* com cultura de folículos pré-antrais de cabra, por meio da avaliação de parâmetros como a sobrevivência, crescimento e desenvolvimento, além da apoptose e proliferação folicular para investigar de maneira comparativa o efeito da fração quinona e o seu principal constituinte (Onco A). O método é aplicável por preceder a realização de protocolos experimentais envolvendo animais e seres humanos.

Pelos parâmetros observados, verificou-se que tanto a fração quanto o seu isolado foram capazes de afetar o desenvolvimento dos folículos pré-antrais de caprinos e que esse efeito foi dependente da concentração. Além disso, evidenciou-se um efeito menos lesivo para Onco A quando comparada ao controle padrão da terapia antitumoral, Doxirrubicina. Com base no modelo utilizado e os efeitos observados, o estudo fortalece a elaboração de novas investigações para avaliar o potencial antitumoral de Onco A na terapia contra o câncer em mulheres (LEIVA-REVILLA et al. 2016).

A partir desses achados e seguindo o mesmo raciocínio no uso deste modelo de estudo, Leiva-Revilla et al. (2017) em outro momento avaliaram os efeitos destes, desta vez, frente à cultura de folículos secundários isolados de caprinos, bem como determinaram a viabilidade e maturação nuclear de oócitos obtidos de folículos

antrais. Esses parâmetros foram avaliados a partir dos tratamentos com *A. oncocalyx*, Onco A, Doxirrubicina e controles (grupo não tratado).

Nas condições estabelecidas, observou-se que a fração quinona e sua molécula isolada não se mostraram tóxicas e não alteraram as taxas de maturação *in vitro* da cultura utilizada neste ensaio, corroborando com os resultados obtidos anteriormente. Entretanto, verificou-se que ambos os compostos comprometeram a viabilidade dos oócitos após uma maturação *in vivo*. Além disso, como demonstrado antes, Onco A apresentou-se menos nociva, quando comparada a controle positivo, a sobrevivência dos folículos secundários e aos oócitos testados (LEIVA-REVILLA et al. 2017).

Diante do exposto, é evidente o potencial biológico das quinonas, incluindo a atividade antimicrobiana, bem como as propriedades farmacológicas apresentadas por Onco A. Assim, torna-se perceptível que esta representa uma importante molécula com aplicação terapêutica promissora. Contudo, cabe ressaltar que não há relatos da sua atividade contra micro-organismos.

Desta maneira, considerando a gravidade da resistência às principais drogas de escolha desenvolvidas pelos MOs, bem como a contribuição dos biofilmes neste fenômeno e a necessidade do desenvolvimento de novos antibióticos e/ou antifúngicos, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de Oncocalixona A, uma benzoquinona isolada de *Auxemma oncacalyx* Taub.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de Oncacalixona A, frente a diferentes linhagens bacterianas e fúngicas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), e a Concentração Bactericida Mínima (CBM), frente a cepas bacterianas Gram Positivas e Gram Negativas de interesse clínico;
- Averiguar o efeito inibitório de Onco A na formação inicial do biofilme bacteriano;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra espécies fúngicas de interesse clínico;
- Analisar por Microscopia de Força Atômica possíveis alterações morfológicas promovidas pelo tratamento com Onco A;
- Avaliar o envolvimento de espécies reativas de oxigênio no efeito antibacteriano;
- Investigar a biocompatibilidade de Onco A.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL

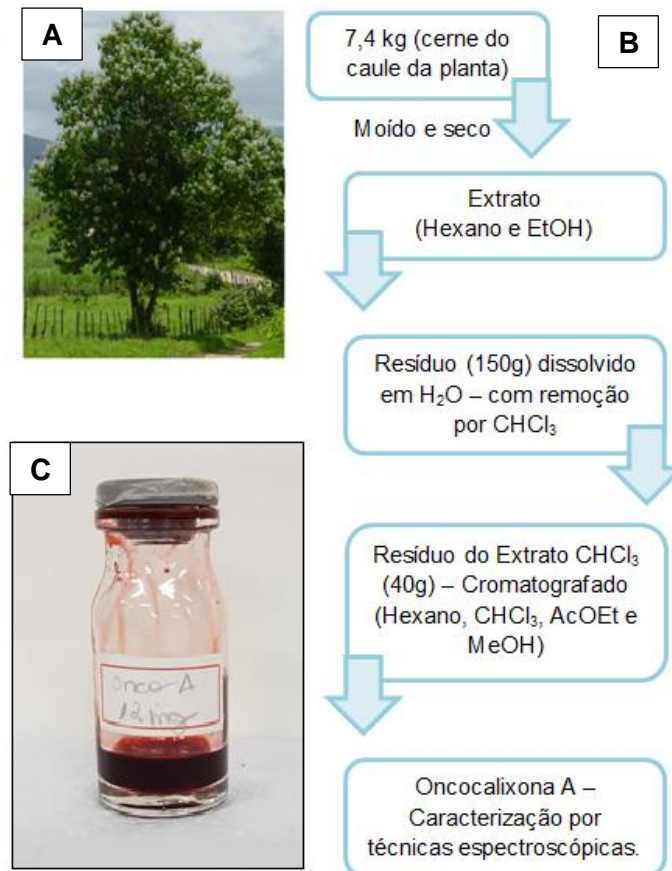
O conteúdo de Oncocalixona A (Onco A) foi obtido em parceria com o Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará - UFC, na pessoa da Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, responsável pela extração e caracterização da substância isolada.

O exemplar vegetal de *Auxemma oncocalix* Taub (Boraginaceae) foi obtido na cidade de Pentecoste, Estado do Ceará, Brasil, em setembro de 1990, e identificada pelo Prof. Dr. Afrânio Gomes. A partir do material vegetal colhido da planta, uma exsicata sob número 18459 foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, localizado no Departamento de Biologia também da UFC/Fortaleza. A metodologia de extração, isolamento e caracterização do material foi descrita por Pessoa et al. (1993, 1995).

Inicialmente, o conteúdo de 7,4 kg do cerne do caule da planta foi moído e seco, e em seguida um extrato foi preparado utilizando hexano e etanol (EtOH). O resíduo obtido, cerca de 150 g, foi dissolvido em H₂O, após a remoção dos solventes, e utilizando clorofórmio (CHCl₃), uma solução aquosa foi então extraída. O conteúdo obtido com extrato clorofórmico (40 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel com diferentes solventes (hexano, CHCl₃, acetato de etila [AcOEt] e metanol [MeOH]). Com a cromatografia na coluna de sílica aquecida, da fração acetato de etila foi possível obter um conteúdo de 850 mg, que posteriormente foi denominada de Onco A, o qual representou cerca de 80% do conteúdo total da preparação. A substância obtida foi submetida à caracterização por diferentes técnicas espectroscópicas (espectroscopia de absorção na região do UV-VIS, espectrometria de massas, espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear em sequências 2D) (PESSOA et al., 1993), antes de ser utilizada nos testes realizados neste estudo.

A **Figura 8** ilustra o esquema de extração a partir da planta bem como a cor avermelhada intensa da substância obtida quando diluída em dimetilsulfóxido (DMSO).

Figura 8: Diagrama da obtenção de Oncocalixona A (Onco A).



Legenda: **(A)** Foto representativa de *Auxemma oncocalyx* Taub; **(B)** Etapas do processamento para a obtenção da substância Onco A; **(C)**. Onco A dissolvida em DMSO. Fonte: BARRETO et al., 2013, com adaptações.

4.2. MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS

4.2.1. Espécies Bacterianas

As cepas bacterianas utilizadas no presente estudo foram provenientes da cultura estoque armazenadas em freezer -80°C no Laboratório de Doenças Infecciosas/Centro de Ciências Agrárias (CCA)/Universidade Federal do Piauí (UFPI), *Campus* Ministro Petrônio Portela, Teresina – PI, sendo estas mantidas sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares.

Um total de 14 linhagens bacterianas foi utilizado nesta investigação, incluindo cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC) e cepas isoladas de espécimes clínicos (**Tabela 3**).

Tabela 3: Espécies bacterianas utilizadas para avaliação do potencial antibacteriano de Onco A.

Bactérias Gram positivas	Bactérias Gram negativas
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC19606
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>E. faecium</i> ATCC 6569	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> EM0104*
<i>S. aureus</i> COL*	
<i>S. aureus</i> MED 55*	
<i>S. epidermidis</i> 70 D*	
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	

Legenda: *Cepas clínicas. Fonte: Autoria Própria, 2019.

4.2.2. Espécies Fúngicas

Para a avaliação da atividade antifúngica foram selecionadas cinco espécies fúngicas (**Tabela 4**). Estas foram provenientes da micoteca do Grupo de Estudos Avançados em Micologia Médica - GEAMICOL, mantidas em posse da Profa. Dra. Tatiane Caroline Daboit, no *Campus* Ministro Reis Velloso/UFPI, em Parnaíba – PI.

Tabela 4: Espécies fúngicas utilizadas para avaliação do potencial antifúngico de Onco A.

Filamentosos	Leveduras
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 13073	<i>Candida albicans</i> ATCC 10234
<i>Sporothrix schenckii</i> ATCC 201679	<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 48184
<i>Trichophyton interdigitale</i> 73826	

Fonte: Autoria própria, 2019.

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ONCOCALIXONA A

4.3.1. Confirmação da pureza das espécies bacterianas

Todas as cepas bacterianas selecionadas foram submetidas à etapa de avaliação da pureza das cepas, envolvendo: cultivo, isolamento e confirmação das espécies mantidas na cultura estoque.

Inicialmente, uma alíquota de 50 µL das culturas estocadas foram inoculadas em caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) enriquecido com extrato de levedura (0,5 % p/v) e, sob condições aeróbicas, foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C. Após o tempo de crescimento, o conteúdo bacteriano foi semeado em meio de cultura TSA (Tryptic Soy Agar, Difco™), pela técnica de esgotamento, para obtenção de colônias isoladas. Em seguida, uma colônia de cada espécie foi semeada em meios de cultura seletivos – diferenciais (Ágar Manitol Salgado [AMS], Ágar Hektoen Entérico [AHE]); Agar Citrato Azida Tween80 Carbonato de sódio [CATC] e após crescimento, sob semelhantes condições de incubação descritas, foram submetidas a testes morfotintoriais, fisiológicos e bioquímicos como preconizado por Winn et al (2008), objetivando a confirmação da identificação microbiana.

Pretendendo, ainda, assegurar a qualidade das cepas bacterianas utilizadas foi realizado a avaliação da sensibilidade antimicrobiana a diferentes fármacos, por meio do teste de disco difusão, como a seguir será descrito, desde que estas quando adequadas apresentam um perfil de susceptibilidade antibiótica característico de cada espécie e cepa analisada.

O ensaio do antibiograma, pela técnica de disco difusão, foi realizado seguindo as normas preconizadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Para isso, semeou-se um com o auxílio de um swab estéril, o inóculo bacteriano contendo 1,0 a 2,0 x 10⁸ UFC/mL, correspondendo a 0,5 na escala de McFarland, em uma placa de Petri com ágar Mueller-Hinton (Difco™) e após secagem do semeio (cerca de 15 minutos) foram aplicados diferentes discos impregnados com antibióticos sobre os inóculos. Após 24 horas de incubação em estufa bacteriológica, a susceptibilidade aos antibacterianos testados foi avaliada pela formação do halo de inibição de crescimento, comparando-o aos valores de referência, como estabelecido pelo CLSI (2018).

Para as bactérias Gram positivas os antibióticos utilizados foram: Penicilina G (10 UI), Cefoxitina (30 µg), Ampicilina (10 µg), Teicoplanina (30 µg), Gentamicina de

altos níveis de resistência (120 µg), Estreptomicina de altos níveis de resistência (300 µg) e Sulfametoxazol + Trimetoprima (25 µg). Enquanto que as espécies Gram negativas foram avaliadas quanto a sensibilidade para os antibióticos: Imipenem (10 µg), Amoxicilina + Ácido clavulânico (30 µg), Ampicilina (10 µg), Ceftazidima (30 µg), Levofloxacina (5 µg), Gentamicina (10 µg), Cefepime (30 µg), Aztreonam (30 µg) e Sulfametoxazol + Trimetoprima (25 µg).

As cepas microbianas que tiveram seu perfil de sensibilidade antibiótica confirmada foram em seguida avaliadas quanto a sensibilidade à Onco A.

4.3.2. Cultivo bacteriano para os experimentos de avaliação da ação antimicrobiana da Onco A

Antes de realização de todos os experimentos as cepas selecionadas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Difco™), e em seguida, em condições aeróbicas, foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C. Após este intervalo de tempo as colônias crescidas isoladamente foram coletadas com alça bacteriológica descartável e suspensas em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v), afim de obter-se um padrão de absorbância entre 0,08 a 0,13 sob comprimento de onda de 625 nm, correspondendo assim a 0,5 na escala de McFarland (1 a $2,0 \times 10^8$ UFC/mL), conforme recomendações da CLSI (2015). Uma vez padronizado, a suspensão bacteriana obtida serviu, posteriormente, para a preparação dos inóculos bacterianos utilizados na execução dos protocolos de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CLSI, 2015).

Afim de se garantir a qualidade e segurança dos protocolos deste estudo, a manipulação das cepas bacterianas foi realizada dentro de condições assépticas recomendadas. Além disso, todos os procedimentos para a execução dos protocolos experimentais foram realizados em cabine de segurança biológica nível 2.

4.3.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

De acordo com as normas preconizadas pela CLSI (2015), o potencial antibacteriano de Onco A foi avaliado por meio do método de determinação da Concentração Inibitória Mínima, utilizando a técnica de microdiluição em caldo.

Inicialmente, o conteúdo de Onco A (em pó) foi diluído em uma solução de DMSO a 100%. A partir desta, uma solução teste foi preparada para cada experimento e para isso volumes de 25 µL da solução estoque foram retirados e diluídos em 975

μL de caldo Mueller-Hinton (Difco™), obtendo uma solução com volume final de 1.000 μL a uma concentração de 302 $\mu\text{g/mL}$ (solução teste), com concentração de DMSO a 10%. Esta preparação foi então utilizada para a execução do protocolo experimental. Em seguida, o inóculo bacteriano previamente padronizado para a escala 0,5 de McFarland, foi diluído em caldo Mueller-Hinton (Difco™), obtendo-se uma concentração de 10^6 UFC/mL (CLSI, 2015).

Utilizando uma placa de microdiluição de 96 poços (KASVI) o efeito antibacteriano foi analisado frente a três cepas bacterianas/placa. O protocolo foi executado adicionando 100 μL da solução teste aos poços da linha A, da coluna 1 a coluna 10 (poços testes: Onco A x Bactéria) e em todos os demais poços da placa adicionou-se um volume de 50 μL de caldo Mueller-Hinton (Difco™). Após essa adição, a solução teste de Onco A foi submetida a uma diluição seriada de razão dois, e para isso retirou-se 50 μL da solução dos poços da linha A, homogeneizando e transferindo-os para os poços da linha B. Em seguida, o mesmo conteúdo foi homogeneizado e transferido para os poços da linha C. Este procedimento repetiu-se até os poços da última linha (Linha H), de onde os últimos 50 μL da diluição foram descartados (CLSI, 2015).

Os poços das colunas 1, 11 e 12 foram destinados aos controles de esterilidade da substância, do crescimento bacteriano (controle negativo) e de esterilidade do meio de cultivo utilizado, respectivamente. Em todos os poços da coluna 1 a esterilidade da substância foi analisada, servindo como padrão comparativo do teste. Os poços da linha A até D da coluna 11, corresponderam ao controle de crescimento de uma cepa; enquanto que poços da linha E a H, da mesma coluna, destinaram-se ao crescimento da segunda cepa utilizada, e o controle de crescimento da terceira cepa foi avaliado nos poços dessas mesmas linhas, na coluna 12. Por fim, os poços das linhas A a D, também da coluna 12, serviram para o controle de esterilidade do meio de cultura (CLSI, 2015).

Em seguida, 50 μL do inóculo bacteriano foram adicionados aos poços testes e aos poços dos controles de crescimento, resultando em uma concentração final de 5×10^5 UFC/mL. Além disso, 50 μL de caldo Mueller-Hinton Difco™ estéril (não inoculado) foram adicionados aos poços do controle de esterilidade (da substância e do meio), de forma que todos os poços da placa obtivessem um volume final de 100 μL . Ao final do experimento a concentração de Onco A em cada um dos poços testes e controle de esterilidade da substância variou de 151 $\mu\text{g/mL}$ a 1,17 $\mu\text{g/mL}$. Todos os

testes foram realizados em triplicata e repetidos por, no mínimo, três vezes (CLSI, 2015).

A menor concentração de Onco A capaz de inibir o crescimento bacteriano visível, foi considerada como a CIM. Esta foi determinada pela leitura visual dos poços, e desta forma aqueles que apresentaram ausência de crescimento microbiano foram considerados positivos e os que apresentaram nitidamente esse crescimento foram considerados negativos. Os resultados também foram analisados por absorbância em leitor de placas ELISA Plate Reader (Leitora Touch Bioeasy), sob comprimento de onda de 630 nm, para calcular a CIM₅₀ através do software GraphPad Prism 7.01.

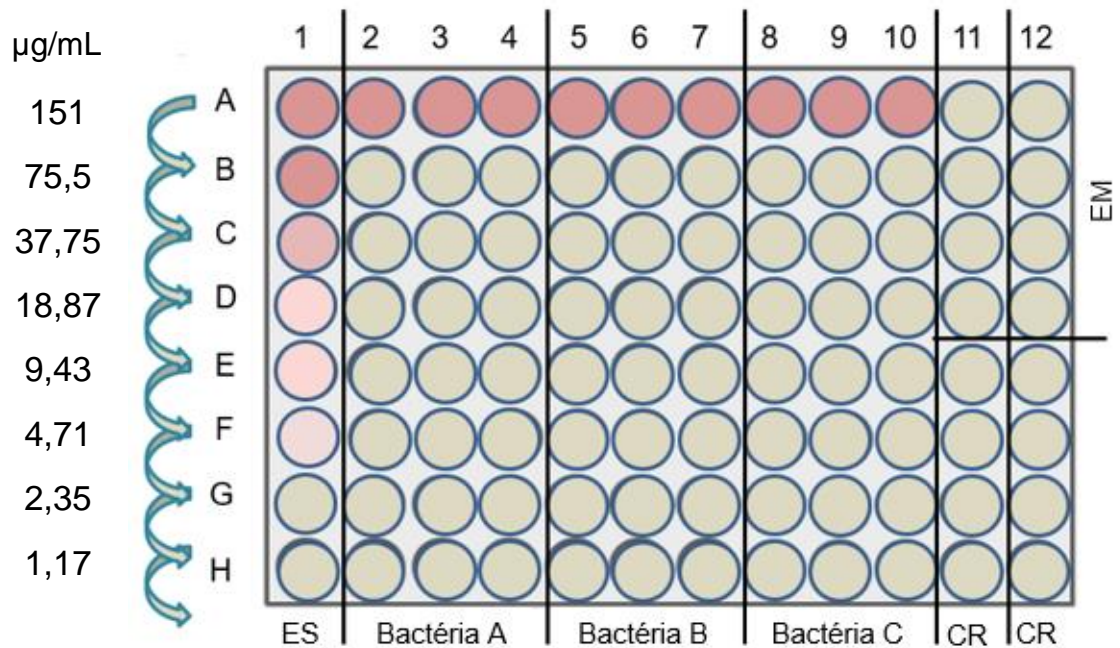
Como controle positivo dos testes, foram utilizados os antibióticos padrão Vancomicina, com concentrações variáveis de 256 a 0,25 µg/mL e Clorexidina, com concentrações variando de 100 a 0,78 µg/mL, para bactérias Gram positivas. Meropenem e Sulfametoxazol+Trimetoprima foram utilizados para bactérias Gram negativas, com concentrações que variaram, respectivamente, de 50 a 0,09 µg/mL e 150 a 0,29 µg/mL, sendo todos estes realizados em uma segunda placa.

4.3.4. Determinação da Concentração Bactericida Mínima

Para avaliar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), consideraram-se os resultados obtidos na CIM. Assim, obedecendo a triplicata, 10 µL dos cultivos provenientes dos poços com concentrações que demonstraram resultados iguais e superiores a CIM foram sub cultivados em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (Difco™). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, em condições de aerobiose. A menor concentração capaz de causar a morte bacteriana, isto é, sem crescimento visível sobre a superfície do ágar, foi considerada como sendo a CBM (CLSI, 2015).

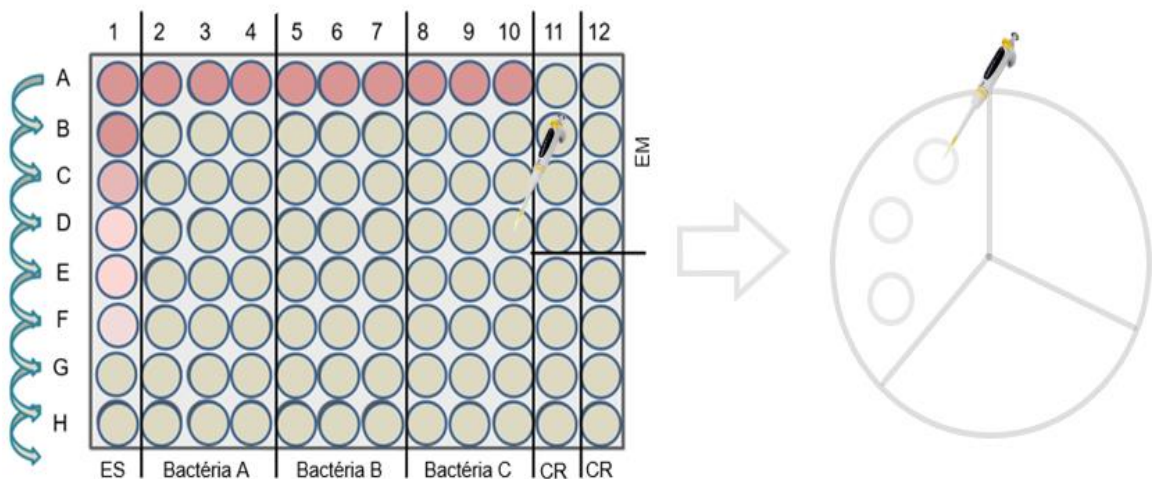
As figuras 9 e 10 ilustram os desenhos experimentais dos protocolos da determinação da CIM e CBM, respectivamente.

Figura 9: Desenho experimental do teste de determinação da CIM *in vitro* de Onco A.



Legenda: ES: Esterilidade da Substância; CR: Controle de Crescimento; EM: Esterilidade do Meio. Fonte: Autoria Própria, 2019.

Figura 10: Desenho esquemático do teste de determinação da CBM de Onco A.



Legenda: ES: Esterilidade da Substância; CR: Controle de Crescimento; EM: Esterilidade do Meio. Fonte: Autoria Própria, 2019.

4.3.5. Inibição da formação do biofilme

O efeito de Onco A em inibir a formação inicial do biofilme também foi avaliado. Cepas padrão formadoras de biofilmes foram selecionadas para investigar a capacidade de Onco A em inibir a formação do biofilme. As espécies utilizadas foram *Staphylococcus aureus* MED 55 e *Staphylococcus epidermidis* 70 D. Para esse ensaio considerou-se a concentração sub - inibitória mínima, uma vez que na CIM não há bactérias viáveis que sejam capazes de formar essa comunidade de células. Assim, a inibição da adesão do biofilme foi avaliada em concentrações equivalentes à 1/2, 1/4 e 1/8 da CIM de Onco A, demonstrada contra as espécies citadas, as quais variaram, de 18,87 a 4,72 µg/mL (*S. aureus* MED 55) e 9,43 a 2,35 µg/mL (*S. epidermidis* 70 D). O efeito da substância, frente à estas cepas, foi determinado em % de inibição em comparação aos controles (0% de inibição), os quais não se adicionou o conteúdo de Onco A e assim não se observou a inibição da adesão bacteriana.

A execução do protocolo seguiu o mesmo procedimento do ensaio de determinação da CIM, diferenciando-se somente pela utilização do meio cultura, o caldo TSB (Tryptical Soya Broth, Bacto™) enriquecido com 0,5% de Glicose, e pela etapa de leitura. Nesta etapa, após 24 horas de incubação a 37°C em condições aeróbicas, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e os poços testes e controles foram lavados com solução salina estéril. Em seguida, o biofilme foi submetido à fixação com 100 µL de metanol (PA) durante 15 minutos e após este procedimento o metanol foi removido e os poços lavados com salina estéril. Utilizando uma solução do corante Cristal Violeta (0,1% p/v) o biofilme foi então corado por 15 minutos. Transcorrido esse tempo, a placa foi lavada com solução salina por três vezes, até completa remoção dos resíduos do corante nos poços relativos ao controle de esterilidade (onde não há bactérias). A leitura, última etapa do protocolo, foi avaliada pela adição de 100 µL de etanol a cada um dos poços testes, com posterior homogeneização e transferência deste produto para uma placa espelho a qual foi submetida à leitura em leitor de placas ELISA Plate Reader (Leitora Touch Bioeasy), sob comprimento de onda de 630 nm (STEPANOVIĆ et al., 2000).

4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ONCOCALIXONA A

4.4.1. Cultivo fúngico e preparação do inóculo para os experimentos

As espécies fúngicas selecionadas para este estudo foram semeadas em ágar Batata Dextrose (KASVI) e incubadas em estufa a uma temperatura de 35°C e mantidas por diferentes tempos de incubação, seguindo as normas preconizadas nos documentos M27-A3 e M38-A2 do CLSI (2008). As espécies filamentosas foram incubadas por sete dias, até a realização do ensaio de determinação da CIM, e as espécies leveduriformes (*C. albicans* ATCC 10234 e *C. neoformans* ATCC 48184) foram incubadas, respectivamente, por 24 e 48 horas.

Os esporos fúngicos de cada cultura foram suspensos em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v), ajustando-se esta suspensão em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 530 nm, a fim de obter-se uma transmitância variável de acordo com cada classe fúngica, sendo esta de 80-82% para os filamentosos e 90% para os leveduriformes. A partir destas suspensões, os inóculos fúngicos foram preparados, sendo o das espécies filamentosas diluído em uma proporção de 1:50, com concentração final de micro-organismos de $0,4 \times 10^4$ - 5×10^4 UFCs/mL em cada poço testado. Enquanto isso, o inóculo das espécies leveduriformes foram diluídos em uma proporção de 1:50 seguida de uma diluição de 1:20, com concentração final de 1×10^3 a 5×10^3 UFCs/mL em todos os poços testes. Ambas as diluições foram realizadas em meio RPMI 1640 (MP Biomedicals, France), tamponado com 3-(N-morfolino) propano ácido sulfônico (MOPs, Vetec, Brasil), seguindo recomendações do fabricante.

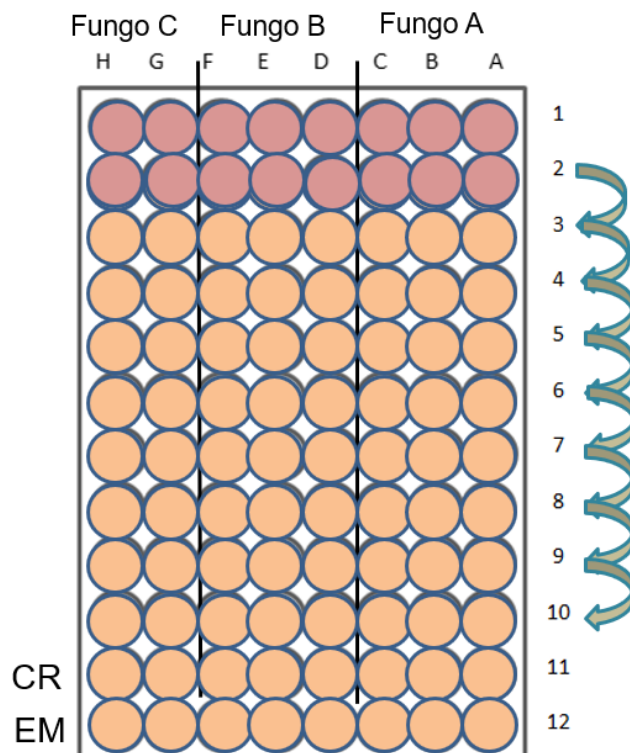
4.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A análise do potencial antifúngico também foi realizada empregando o método de microdiluição em caldo por meio da determinação da CIM, obedecendo às orientações do documento M27-A3 e M38-A2 da CLSI (2008). Utilizando uma placa de microdiluição com 96 poços com formato em U (Gralplast) em sentido vertical, foi possível avaliar o efeito da substância em estudo frente a três espécies fúngicas, bem como determinar os controles de crescimento das mesmas e o controle de esterilidade do meio de cultura. O preparo da substância procedeu-se conforme descrito no item 4.3.3, diferenciando pela utilização do meio RPMI 1640 (MP Biomedicals, France)

tamponado com MOPs (Vetec, Brasil), no qual Onco A foi diluída (solução teste) para posterior realização do ensaio.

Inicialmente, 100 μL do meio RPMI 1640 tamponado com MOPs foram adicionados nos poços da linha 2 a linha 11. Em seguida, 100 μL de Onco A (solução teste) foram adicionados aos poços das linhas 1 e 2, e uma diluição seriada de razão dois foi realizada dos poços da linha 2 até os poços da linha 10. Logo após, 100 μL do inóculo fúngico preparado conforme descrito no item 4.4.1 foram adicionados aos poços, com um esquema experimental de divisão da placa obedecendo a uma realização do teste em triplicata, conforme demonstrado na **Figura 11**. A triplicata da terceira espécie fúngica foi realizada em outra microplaca para completa execução do ensaio. Nesta, também foram monitorados o controle positivo da ação de antifúngicos de escolha terapêutica (Itraconazol® - Sigma, St. Louis, USA) (em concentrações de 16 a 0,0313 $\mu\text{g/mL}$). Os poços das linhas 11 e 12 foram destinados, respectivamente, aos controles de crescimento fúngico, que obedeceram a divisão das espécies, e de esterilidade do meio de cultura. Ao final todos os poços testes e controle obtiveram um volume de 200 μL (CLSI, 2008) (**Figura 11**).

Figura 11: Desenho experimental do ensaio antifúngico *in vitro* de Onco A.



Legenda: CR: controle de crescimento; EM: esterilidade do meio. Fonte: Autoria própria, 2019.

4.5. ESTUDO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DE ONCOCALIXONA A

4.5.1. Curva de Morte

A linhagem que sofreu efeito bactericida foi então selecionada para investigar tal efeito de Onco A contra a mesma, na concentração em que a substância exerce uma ação letal. Para isso, seguiu-se o protocolo experimental de Pessini et al. (2003), com adaptações. Inicialmente, a partir da padronização da escala de McFarland (conforme descrito no item 4.3.2), preparou-se o inóculo bacteriano para obter-se uma concentração de 5×10^5 UFC/mL. Em seguida, o mesmo foi exposto à concentração da substância que efetivamente mata a bactéria, estabelecendo assim dois grupos de tratamentos (grupo tratado com Onco A e grupo sem tratamento [controle de crescimento]).

Logo após, a preparação foi incubada em estufa bacteriológica a 37 °C. Nos tempos de 4, 8 e 24 horas de incubação, o conteúdo do meio de cultura cultivado foi diluído em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v), em concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , para o grupo tratado, e diluições de 10^{-1} a 10^{-6} para o grupo controle (sem tratamento), com posterior semeio de 100 µL destas diluições em ágar Mueller-Hinton (Difco™). As placas foram incubadas em estufa por 24 horas e transcorrido esse tempo o número de colônias bacterianas crescidas na superfície do ágar foi contabilizado a fim de determinar-se em que momento a molécula inviabiliza por completo o crescimento bacteriano (PESSINI et al., 2003). Os resultados são expressos em \log^{10} .

4.5.2. Análise por Microscopia de Força Atômica

Com o objetivo de observar possíveis alterações morfológicas causadas pela ação da OncoA, cultivos microbianos das cavidades das microplacas, referentes ao controle de crescimento bacteriano, aos das concentrações sub inibitórias mínimas (sub-CIM) dos grupos tratados com Onco A e do antibiótico padrão, foram avaliados, por meio da técnica de Microscopia de Força Atômica (MFA). Para tanto, três linhagens bacterianas selecionadas, sendo elas: *S. epidermidis* ATCC 12228, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. maltophilia* EM0104 foram submetidas a este ensaio experimental.

O inóculo bacteriano utilizado para obtenção das imagens foi de 5×10^5 UFC/mL e para o tratamento da amostra procedimentos semelhantes aos descritos por Araújo

et al. (2015) foram utilizados. Em resumo, após 24 horas de incubação do ensaio de determinação da CIM, o conteúdo de meio cultura dos poços dos grupos tratados (com Onco A e antibiótico padrão) e não tratados (controle de crescimento), foi depositado na superfície de uma lâmina de vidro. Em seguida a mesma foi submetida a etapa de secagem em estufa bacteriológica a 37 °C, por 10 minutos. Transcorrido esse tempo, as amostras foram então cuidadosamente lavadas com água destilada e submetidas a secagem nas mesmas condições descritas acima.

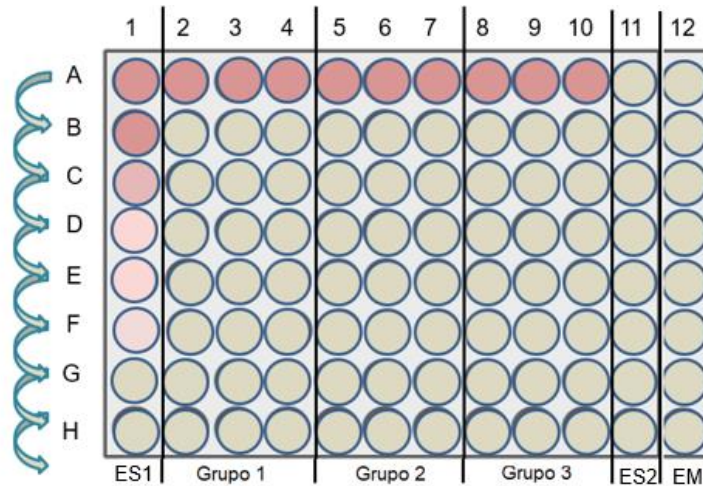
Após esse preparo, as análises foram então realizadas utilizando o microscópio modelo TT-AFM (AFM Workshop - EUA), no modo de contato intermitente, usando pontas TAP300-G10 (TED PELLA, INC.) com uma frequência de ressonância de aproximadamente 250,53 kHz. Múltiplas áreas (0.3:0.3 µm) de cada amostra foram examinadas com o propósito de verificar a média de tamanho (altura em nanômetros) e rugosidade média de bactérias tratadas e não tratadas, utilizando o programa Gwyddion 2.45.

4.5.3. Envolvimento do estresse oxidativo no efeito antibacteriano de Onco A

Para avaliar o possível mecanismo de ação do efeito antibacteriano de Onco A, por meio da participação do estresse oxidativo, foi realizado um ensaio utilizando um inibidor desta vida, seguindo o protocolo experimental descrito por Cursino et al. (2005), com adaptações de Marinho-Filho (2012). Desta maneira, empregando o Ácido L-ascórbico (Vitamina C) três grupos de diferentes tratamentos foram instituídos: Grupo 1 (Bactérias tratadas com Onco A), Grupo 2 (Bactérias tratadas com Onco A associada ao Ácido L-ascórbico) e Grupo 3 (Bactérias pré-tratadas com Ácido L-ascórbico).

O Grupo 1 correspondeu a realização do protocolo padrão estabelecido neste estudo (descrito no item 4.3.3). No Grupo 2, uma solução de Onco A associada ao Ácido L-ascórbico foi preparada. A concentração do agente inibidor selecionado foi de 50 µg/mL, determinada previamente e que não apresentou efeito antibacteriano. No Grupo 3, a linhagem bacteriana selecionada foi pré-tratada com agente inibidor e incubada por 24 horas em estufa bacteriológica a 37 °C. Após esse tempo, procedeu-se o protocolo de determinação da CIM de Onco A, conforme descrito anteriormente. A participação do estresse oxidativo foi determinada a partir da alteração ou não do valor da CIM para a linhagem selecionada para esta investigação. A **Figura 12** mostra o esquema de realização do ensaio.

Figura 12: Estudo do efeito antibacteriano de Onco A pelo envolvimento do estresse oxidativo.



Legenda: ES1: esterilidade da substância (Onco A); Grupo 1: tratamento unicamente com Onco A; Grupo 2: Onco A associada ao ácido ascórbico; Grupo 3: pré-tratamento com ácido ascórbico, seguido do ensaio com Onco A. ES2: esterilidade da substância (Onco A + ácido ascórbico); EM: esterilidade do meio. Fonte: Autoria própria, 2019.

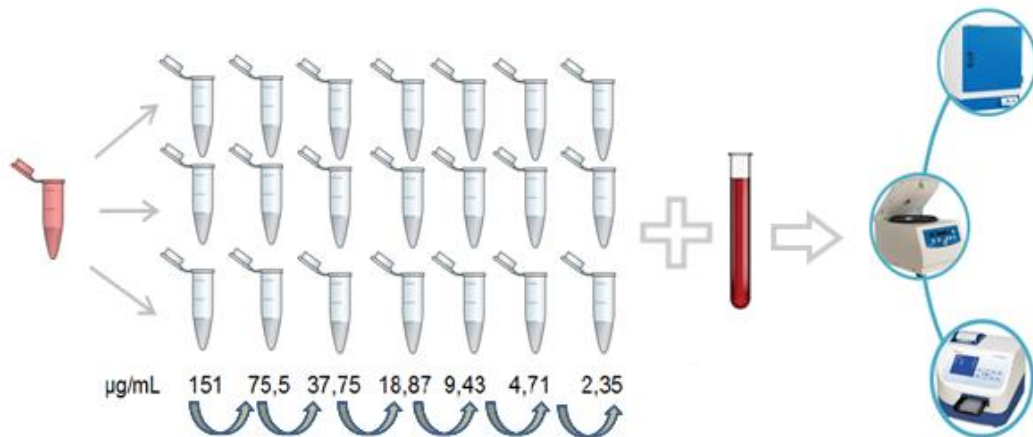
4.6. ENSAIO DE BIOCOMPATIBILIDADE

Através da avaliação da atividade hemolítica de Onco A, a sua biocompatibilidade foi investigada, seguindo o ensaio experimental descrito por Sahariah et al. (2015). Inicialmente, uma amostra sanguínea humana foi coletada em tubos de ensaio contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (1,8 mg/mL) para posterior obtenção dos eritrócitos (hemácias). Em seguida, essa amostra foi centrifugada e o plasma foi retirado. O conteúdo celular foi lavado por três vezes e ressuspendido em solução salina estéril (0,85%) até a obtenção de um homogenato de hemácia a uma concentração de 4%.

Uma vez obtido o conteúdo de eritrócitos, seguiu-se a execução do ensaio de biocompatibilidade. Para isso, 300 µL de Onco A (a uma [302 µg/mL]) foram submetidos a uma diluição seriada de razão dois, em solução salina estéril, produzindo-se assim as concentrações analisadas no presente estudo, e que variaram de 151 µg/mL a 2,35 µg/mL. Após a diluição, 150 µL do conteúdo de eritrócitos obtido anteriormente foi adicionado a cada uma das diluições de Onco A. Triton-X (0,1% v/v) foi utilizado como controle positivo, enquanto que o controle negativo foi estabelecido pelo uso da solução salina a uma concentração de 0,85%. Logo após, a preparação

foi incubada por 30 min a 37 °C e transcorrido esse tempo, foi submetida à centrifugação a 10.000 g por 1 min. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços (KASVI) e a hemólise foi avaliada por espectrofotometria a 492 nm, utilizando leitor de placas ELISA Plate Reader (Leitora Touch Bioeasy). O ensaio foi realizado em triplicata (SAHARIAH et al., 2015). A **Figura 13** demonstra o esquema de realização do ensaio.

Figura 13: Esquema do ensaio de Biocompatibilidade de Onco A, em triplicata.



Fonte: Autoria própria, 2019.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos na determinação da CIM e na inibição da formação do biofilme foram analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism 7.01, com análise de variância (ANOVA) e aplicação do pós-teste de Tukey, afim de se avaliar as diferenças entre os grupos. Na análise por Microscopia de Força Atômica, os resultados obtidos foram analisados utilizando a versão GraphPad Prism 7.01, a fim de ser obter a média de tamanho e rugosidade média da superfície das células bacterianas tratadas com Onco A foi aplicado o teste ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey, com um “n” de 14 amostras. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média).

5. RESULTADOS

5.1. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* DE ONCOCALIXONA A

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a benzoquinona em estudo demonstrou um potencial antibacteriano contra todas as espécies Gram positivas e contra duas das quatro espécies Gram negativas analisadas. As concentrações de Onco A capazes de inibir o crescimento bacteriano variaram desde a maior concentração testada (151 µg/mL) até a concentração de 9,43 µg/mL (**Tabela 5**). A substância em estudo apresentou um potencial inibitório contra importantes bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. Tal efeito mostrou-se promissor, inibindo o crescimento bacteriano, com concentrações variáveis, tanto de cepas padrão quanto de cepas obtidas de espécimes clínicos isolados de processos infecciosos humanos.

Dentre as espécies testadas, observou-se uma maior sensibilidade à ação de Onco A para a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, com um valor de CIM de 9,43 µg/mL. Adicionalmente, a molécula também apresentou efeito contra a espécie *S. aureus* ATCC 29213, com um valor de CIM de 18,87 µg/mL, conforme demonstrado na **Tabela 5** e na **Figura 14**. Não diferente, os valores para as cepas *S. aureus* COL e *S. aureus* MED 55, ambas oriundas de processos infecciosos, também se mostraram promissores, com CIM de 37,75 e 18,87 µg/mL, respectivamente.

Os valores de CIM de Onco A evidenciam uma relevante atividade antibacteriana contra espécies de importância clínica, pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. Além destas, a substância também exerceu ação contra bactérias do gênero *Enterococcus* spp, com concentrações de 151 µg/mL e 75,5 µg/mL. Também foi possível perceber que a substância testada possui ação antibacteriana contra a espécie *S. mutans* ATCC 25175, com uma CIM de 75,5 µg/mL.

Para as bactérias Gram negativas utilizadas, a molécula foi capaz de inibir o crescimento do espécime clínico de *S. maltophilia* EM0104, em uma concentração de 75,5 µg/mL. Verificou-se ainda que a substância inibiu o crescimento da espécie *A. baumannii* ATCC 19606 na maior concentração testada no ensaio antibacteriano (151 µg/mL). Por outro lado, não se constatou atividade frente as espécies de *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (**Tabela 5**).

Tabela 5: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) de Onco A para atividade antibacteriana *in vitro*.

Cepas bacterianas	Atividade antibacteriana de Onco A		Antibióticos
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	75,5	>151	4 *
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	75,5	>151	256 *
<i>E. faecium</i> ATCC 6569	151	>151	< 1 *
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	37,75	>151	2 *
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	18,87	>151	1 *
<i>S. aureus</i> COL	37,75	>151	1 *
<i>S. aureus</i> MED 55	18,87	>151	1 *
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	9,43	151	1 *
<i>S. epidermidis</i> 70 D	37,75	>151	2 *
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	75,5	>151	< 1**
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	151	>151	< 2****
<i>E. coli</i> ATCC 25922	s. a.	s. a.	< 0,1***
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	s. a.	s. a.	< 0,1***
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	s.a.	s.a	< 0,39***
<i>S. maltophilia</i> EM0104	75,5	>151	< 2****

Legenda: s.a.: sem atividade; Antibióticos: Vancomicina*; Clorexidina**; Meropenem***; Sulfametoxazol+Trimetoprima****. Fonte: Autoria própria, 2019.

A partir dos valores determinados como a CIM de Onco A, calculou-se os valores para a CIM₅₀ para as linhagens nas quais a substância apresentou potencial inibitório. A CIM₅₀ foi determinada como a concentração da molécula capaz de induzir 50% do seu efeito máximo. Como demonstra a **Tabela 6**, os valores de CIM₅₀ da molécula variaram de 3,79 a 57,22 µg/mL. Com base nesses valores, percebe-se que essa benzoquinona, em baixas concentrações, inibe o crescimento bacteriano, principalmente das espécies do gênero *Staphylococcus* spp.

A exemplo disso, com uma CIM₅₀ de 3,79 µg/mL, Onco A já inibe o crescimento da espécie *S. epidermidis* ATCC 12228, demonstrando um potencial antibacteriano contra esta linhagem. Além desta observação, a molécula apresentou uma CIM₅₀ de 4,15 µg/mL frente a linhagem de *S. aureus* COL, um espécime clínico resistente à meticilina. Esses dados permitem observar a atividade desta molécula em concentrações abaixo da CIM.

Tabela 6: Valores de CIM₅₀ para a atividade antibacteriana de Onco A.

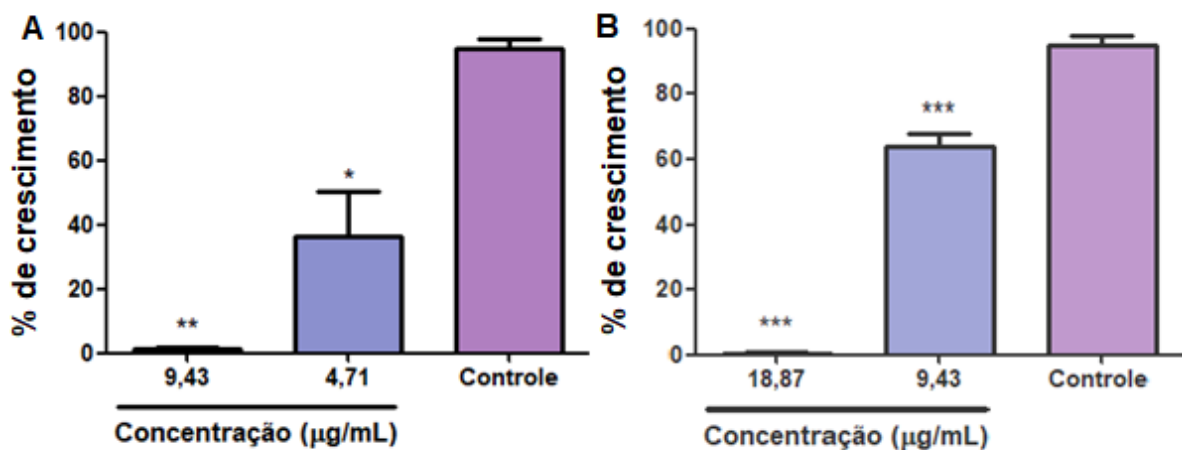
Bactérias	CIM₅₀ µg/mL
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8,21
<i>S. aureus</i> COL	4,15
<i>S. aureus</i> MED55	9,30
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	3,79
<i>S. epidermidis</i> 70D	8,68
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	35,80
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	57,22
<i>E. faecium</i> ATCC 6569	50,70
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	56,05
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	17,18
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	53,69
<i>S. maltophilia</i> EM0104	42,09

Uma vez determinados os valores para CIM, investigou-se a Concentração Bactericida Mínima (CBM), que, enquanto considerada como a menor concentração capaz de, efetivamente, matar o micro-organismo, ou seja, exercer uma ação letal contra este, mostrou-se superior à concentração inicial testada no ensaio de determinação da CIM, isto é, 151 µg/mL, frente a todas as cepas bacterianas testadas, exceto para a linhagem de *S. epidermidis* ATCC 12228, que teve CBM igual a 151 µg/mL.

Além da interpretação visual, os resultados das CIMs para as linhagens de *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. aureus* ATCC 29213 foram analisados por absorvância em leitor de placas ELISA Plate Reader (Leitora Touch Bioeasy), sob comprimento de onda de 630 nm, para comparações entre os grupos tratados e controle de crescimento (sem tratamento).

A partir desta leitura, constatou-se que nas CIMs de Onco A frente a estas duas linhagens bacterianas, a ausência de crescimento foi representada por um percentual próximo a 0%, demonstrando desta maneira uma inibição estatisticamente significativa quando comparadas aos grupos controles (sem tratamento) ($p < 0,05$). Para ambas as espécies analisadas, verificou-se ainda que na concentração sub – inibitória, é possível obter uma inibição significativa em relação ao controle de crescimento. Conforme observado na **Figura 14**, em suas respectivas concentrações sub-inibitórias, Onco A ainda é capaz de inibir o crescimento bacteriano em aproximadamente 40 e 60%, para as espécies analisadas.

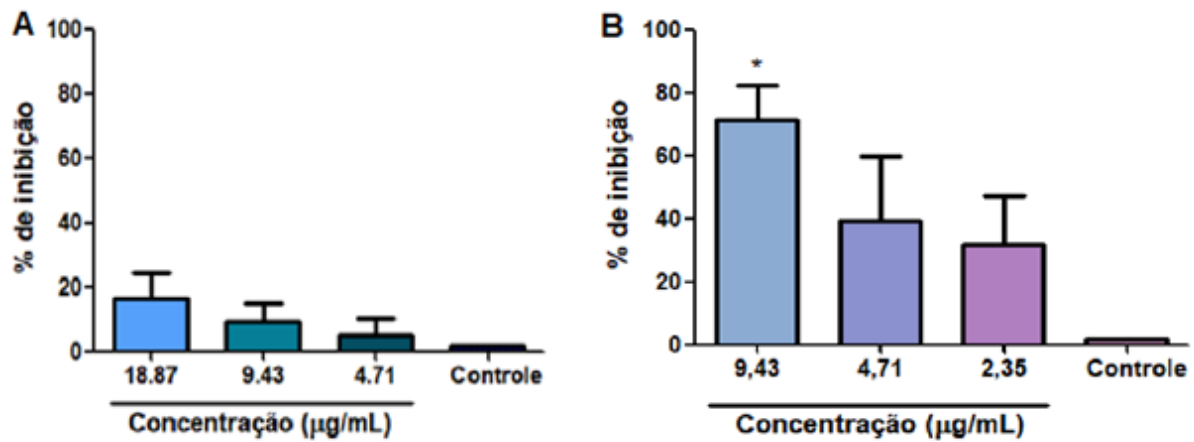
Figura 14: Percentual de crescimento bacteriano no tratamento com Onco A frente as linhagens de *S. epidermidis* ATCC 12228 (A) e *S. aureus* ATCC 29213 (B). Os grupos são comparados ao controle de crescimento (sem tratamento), com $p < 0,05$.



5.2. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO INICIAL DO BIOFILME

No ensaio realizado com a cepa padrão *S. epidermidis* 70 D, evidenciou-se que em sua concentração sub-inibitória mínima (18,87 µg/mL), Onco A não apresentou uma inibição significativa, impedindo apenas 20% da formação do biofilme. Por outro lado, no biofilme produzido pela cepa de *S. aureus* MED 55, Onco A inibiu em sua concentração de 9,43 µg/mL, cerca de 70% dessa formação quando comparado ao controle, resultado este estatisticamente significativo ($p < 0,05$), conforme demonstrado na **Figura 15**.

Figura 15: Efeito de Onco A na inibição da formação inicial dos biofilmes de *S. epidermidis* 70 D (A) e *S. aureus* MED 55 (B). Os grupos são comparados ao grupo controle (sem tratamento) ($p < 0,05$).



5.3. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ONCOCALIXONA A

Nos resultados obtidos através da determinação da CIM, verificou-se que a Onco A não apresentou atividade contra as espécies fúngicas selecionadas, constatando-se que para isso, uma concentração superior a 151 µg/mL é necessária, enquanto que os valores obtidos para o controle positivo (Itraconazol) variam de 0,125 µg/mL e 0,06 µg/mL (**Tabela 7**).

Tabela 7: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de Onco A para atividade antifúngica *in vitro*.

Espécies fúngicas	Atividade antifúngica de Onco A		Itraconazol
	CIM (µg/mL)		CIM (µg/mL)
<i>A. fumigatus</i> ATCC 13073	>151		0,125
<i>S. schenckii</i> ATCC 201679	>151		≤0,25
<i>T. interdigitale</i> 73896	>151		0,125
<i>C. albicans</i> ATCC 10234	>151		0,25
<i>C. neoformans</i> ATCC 48184	>151		0,06

Fonte: Autoria própria, 2019.

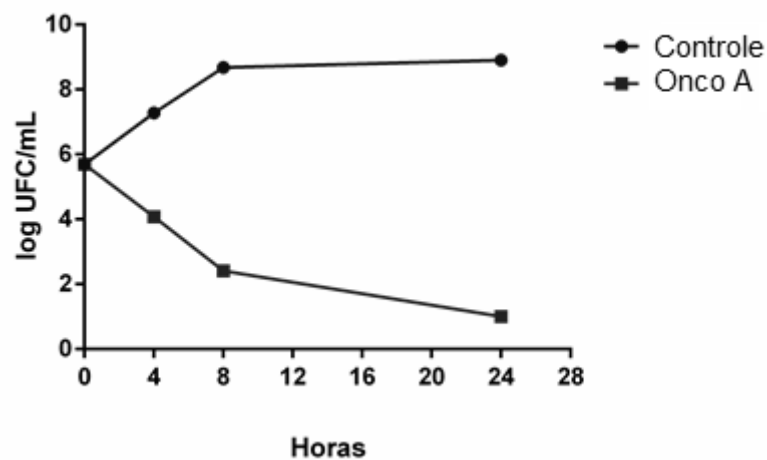
5.4. ESTUDO DO EFEITO ANTIBACTERIANO DE ONCOCALIXONA A

5.4.1. Curva de morte

A partir da determinação da CBM de Onco A, verificou-se que na concentração de 151 µg/mL, a molécula exerce um efeito bactericida contra a linhagem de *S.*

epidermidis ATCC 12228. Na posse dessa informação, investigou-se o efeito antibacteriano da molécula contra esta bactéria em função do tempo, por meio da realização da curva de morte. De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que como esperado, o grupo controle aumenta sua população entre os tempos de 4 e 8 horas, caracterizado pela fase exponencial do crescimento bacteriano, seguido da fase estacionária, momento em que a concentração bacteriana se estabelece (tempo entre 8 e 24 horas). Diferentemente, no grupo tratado com Onco A, a molécula já exerce seu efeito contra a espécie nas horas iniciais de crescimento, inviabilizando a reprodução da população microbiana. No tempo entre 4, 8 e 24 horas, observa-se uma diminuição na concentração de bactérias, observando-se que no tempo de 8 horas o número de micro-organismos reduz acentuadamente, assim como no tempo de 24 horas, conforme mostra a **Figura 16**.

Figura 16: Efeito de Onco A na ação bactericida contra *S. epidermidis* ATCC 12228, em função do tempo.



5.4.2. Análise por Microscopia de Força Atômica

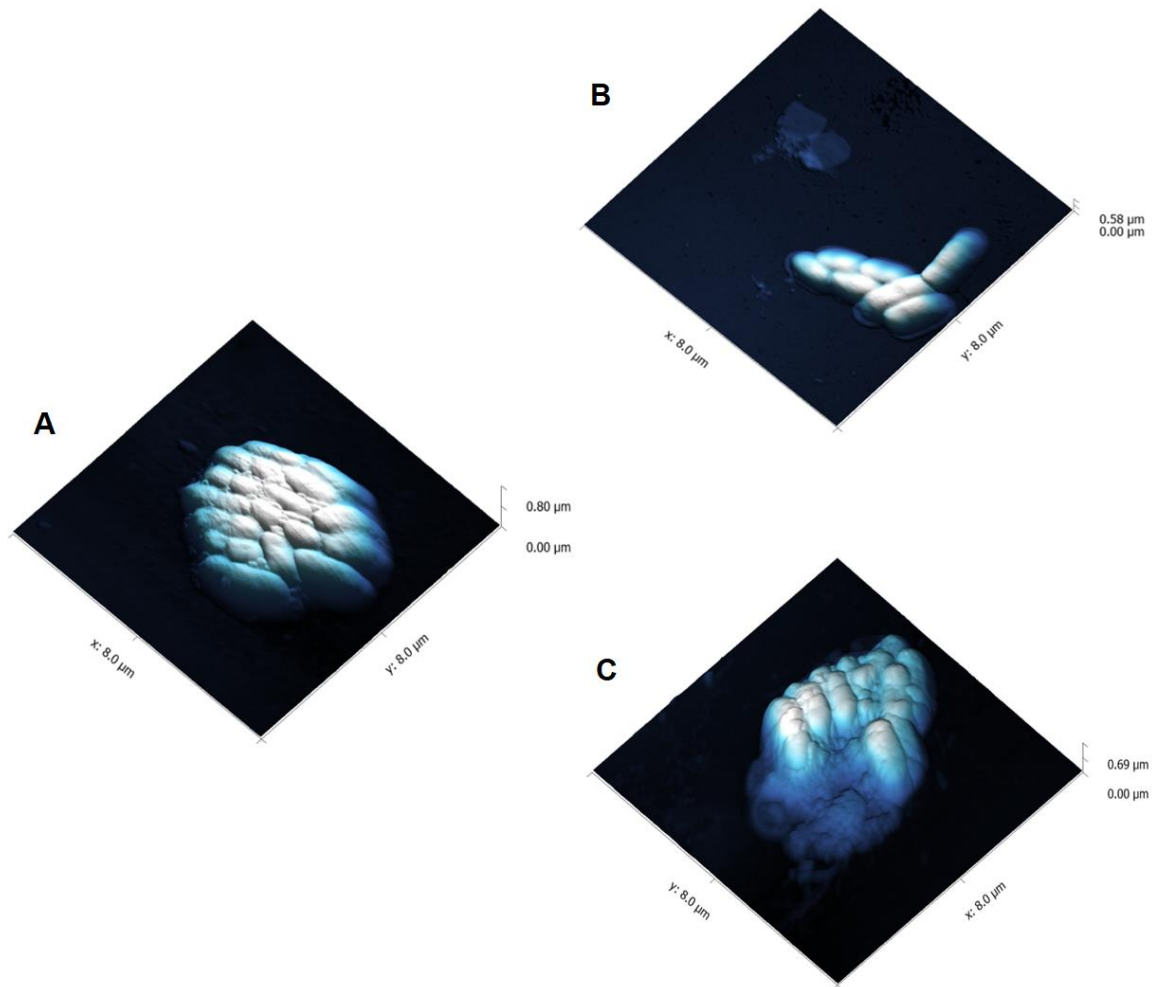
Buscando avaliar se o efeito inibitório observado estaria relacionado a alterações morfológicas, por meio da MFA, três linhagens bacterianas foram selecionadas e analisadas por esta metodologia. Dado o efeito significativo de Onco A contra a espécie *S. epidermidis* ATCC 12228 e a ausência de relatos na literatura que mostrem o efeito de produtos naturais na morfologia de linhagens de interesse clínico, como *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. maltophilia* EM0104, estas foram então submetidas as análises por MFA. As três espécies bacterianas são

responsáveis por graves quadros infecciosos e considerando o efeito promissor da molécula, diante desta problemática, constatou-se que ao analisar a morfologia bacteriana, importantes alterações estruturais ocorreram após o tratamento com a mesma.

Conforme demonstrado na **Figura 17**, no grupo Controle (Sem tratamento) a espécie *L. monocytogenes* ATCC 7644 apresentou um crescimento característico desta espécie, com morfologia de um bacilo Gram positivo flagelado. No grupo sub – CIM verifica-se que o tratamento com a molécula em estudo alterou a morfologia bacteriana de modo que se observa células de menor tamanho e estruturalmente diferentes do grupo Controle. Além disso, neste mesmo grupo, é possível verificar a presença de células rompidas, com liberação de conteúdo intracelular. Na concentração sub - CIM do tratamento com o antibiótico padrão, observa-se alterações morfológicas relacionadas à parede celular bacteriana, alvo do fármaco utilizado (Vancomicina).

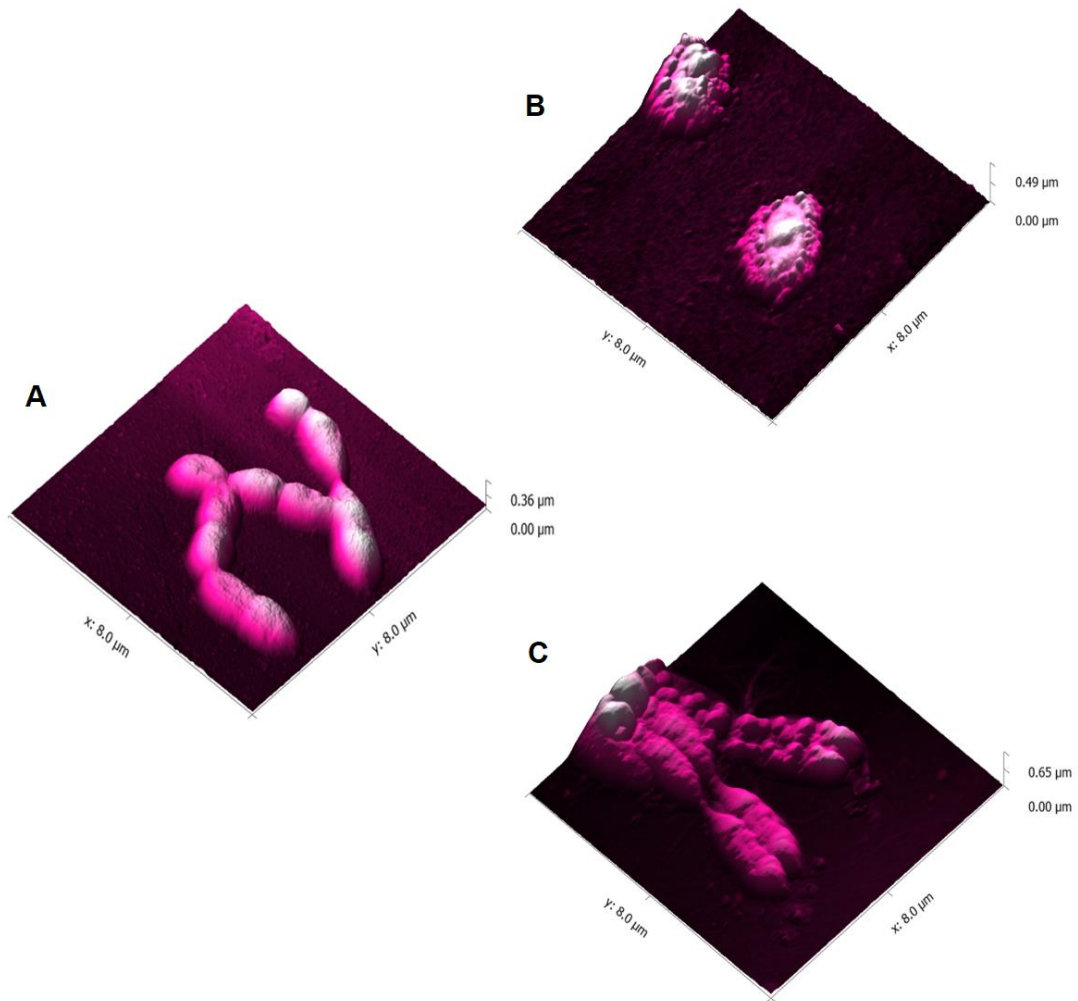
Características muito semelhantes são observadas no tratamento para a cepa *S. maltophilia* EM0104. A **Figura 18**, apresenta as alterações observadas para este micro-organismo Gram negativo. Além destas, o tratamento com Oncocalixona A para a linhagem *S. epidermidis* ATCC 12228 também promoveu modificações na morfologia dessa espécie. Quando comparado ao grupo controle, que apresentou crescimento característico de cocos Gram positivos, é possível perceber no grupo tratado com Onco A, um comprometimento da estrutura bacteriana, com tamanho ligeiramente diminuído e superfície alterada, conforme evidenciado na **Figura 19**.

Figura 17: Imagens por MFA do tratamento com Onco A e antibiótico padrão (Vancomicina) para a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644.



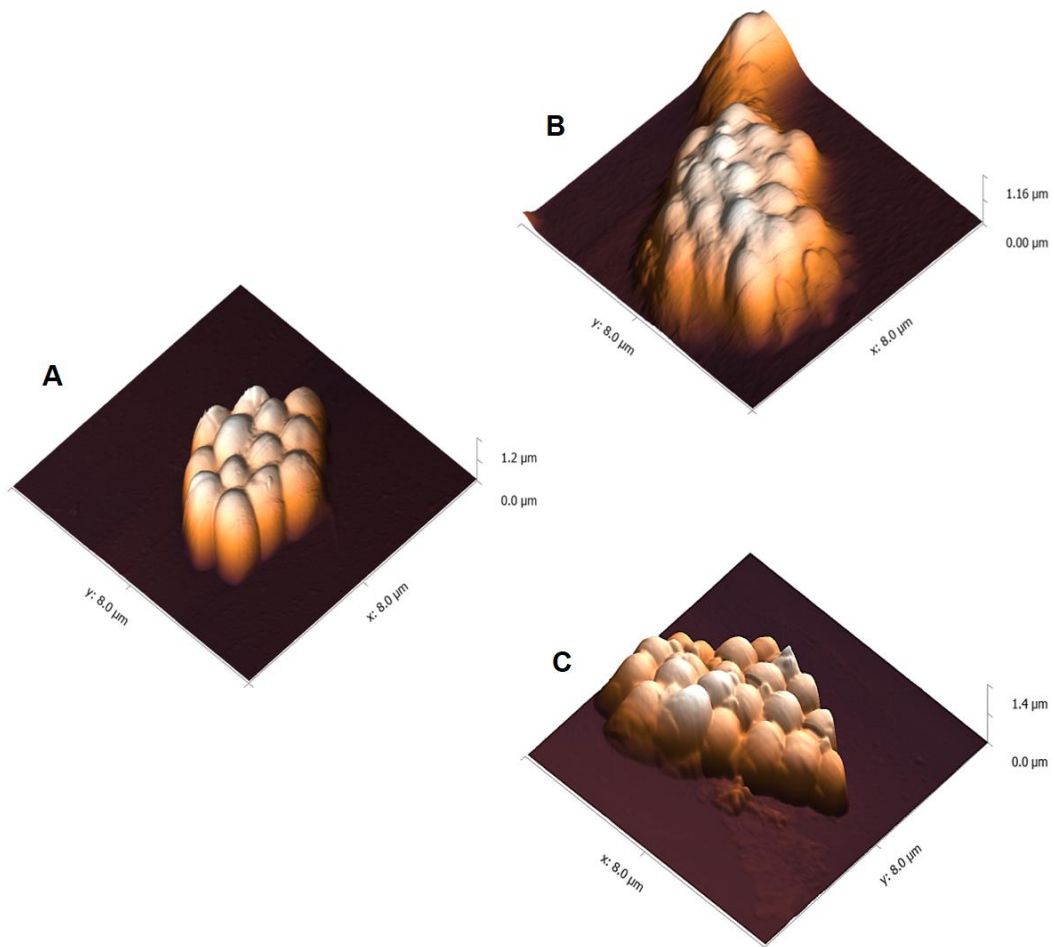
Legenda: (A) Controle; (B) bactérias tratadas com Onco A em concentração sub – CIM; (C) bactérias tratadas com antibiótico padrão. Barras de escala 8 μm, com uma resolução de 512 pixels.

Figura 18: Imagens por MFA do tratamento com Onco A e antibiótico padrão (Sulfametoxazol + Trimetroprima) para a cepa *S. maltophilia* EM0104.



Legenda: (A) Controle; (B) bactérias tratadas com Onco A em concentração sub – CIM; (C) bactérias tratadas com antibiótico padrão. Barras de escala 8 μm, com uma resolução de 512 pixels.

Figura 19: Imagens por MFA do tratamento com Onco A e antibiótico padrão (Vancomicina) para a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228.



Legenda: (A) Controle; (B) bactérias tratadas com Onco A em concentração sub – CIM; (C) bactérias tratadas com antibiótico padrão. Barras de escala 8 μm , com uma resolução de 512 pixels.

Em uma análise quantitativa (**Figura 20**), as características de tamanho e rugosidade média das bactérias bacilares selecionadas, demonstraram diferenças estatisticamente significativas, em relação ao grupo controle. Para a espécie *S. epidermidis* ATCC 12228, apenas no parâmetro de rugosidade média evidenciou-se uma significativa diferença estatística.

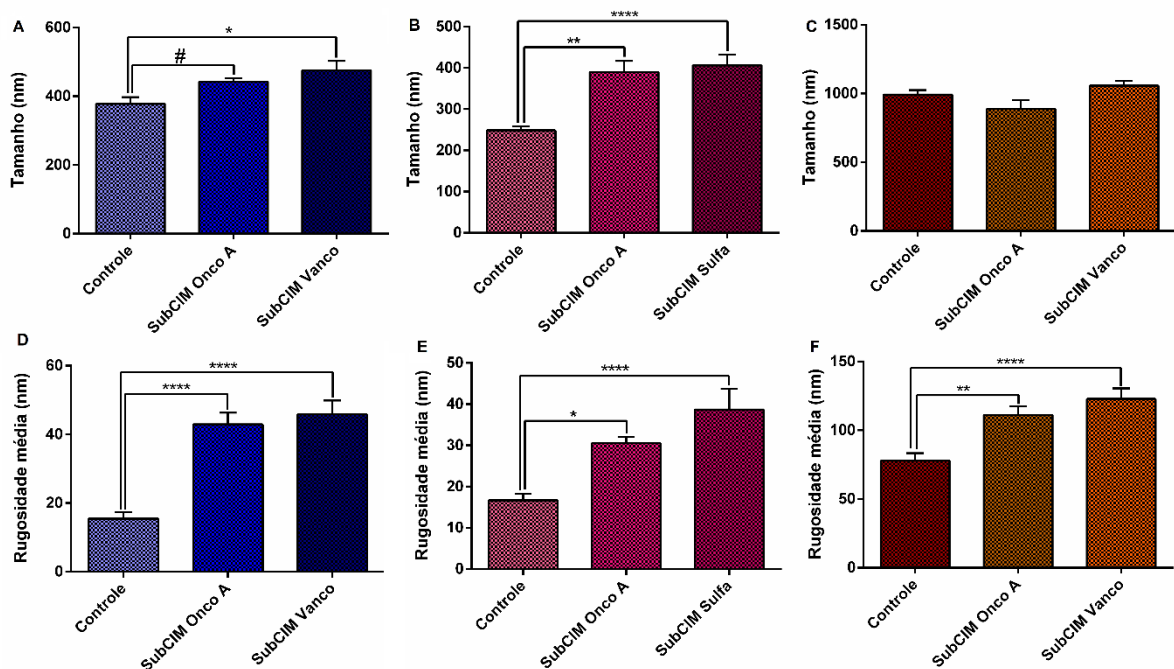
No tratamento com Onco A, *L. monocytogenes* ATCC 7644 apresentou um tamanho médio de aproximadamente 470 nm, em sua concentração sub CIM. O grupo tratado com antibiótico apresentou um tamanho em média de 490 nm. No grupo controle verificou-se um tamanho médio próximo a 400 nm (**Figura 20 - A**). A análise das alterações na superfície bacteriana, através do parâmetro da rugosidade média, evidenciou modificações estatisticamente significativas nos grupos da concentração

sub CIM, para o tratamento com a molécula em estudo e o antibiótico padrão utilizado, com valores de 45 e 48 nm, respectivamente, se comparados ao grupo controle, que apresentou em torno de 17 nm (**Figura 20 - D**).

Para a linhagem *S. maltophilia* EM0104, o grupo controle apresentou um tamanho médio de 250 nm. Por outro lado, o tratamento com Onco A alterou este parâmetro para aproximadamente 400 nm, na sub CIM. Enquanto que no grupo tratado com o antibiótico apresentou um tamanho entorno de 420 nm, na mesma concentração (**Figura 20 - B**). Não diferente, as alterações na superfície bacteriana para esta cepa também foram expressivas, e a rugosidade média apresentou-se com valores de 30 nm, para o tratamento com Onco A e 39 nm, para o tratamento com o antibiótico, em comparação ao grupo controle com 18 nm (**Figura 20 - E**).

Ao analisar estes mesmos parâmetros para a linhagem *S. epidermidis* ATCC 12228, não se observou diferença estatística entre os grupos, no que diz respeito ao tamanho médio (**Figura 20 - C**). Entretanto, a rugosidade desta espécie mostrou-se estatisticamente alterada, após os tratamentos com Onco A e o antibiótico (**Figura 20 - F**). As alterações nestes dois parâmetros para as linhagens bacterianas analisadas são comparadas ao grupo controle, com $p < 0,0001$, conforme mostra a **Figura 20**.

Figura 20: Alterações das médias de tamanho e rugosidade após o tratamento com Onco A e antibiótico padrão para as linhagens bacterianas *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A e D), *S. maltophilia* EM0104 (B e E) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (C e F).

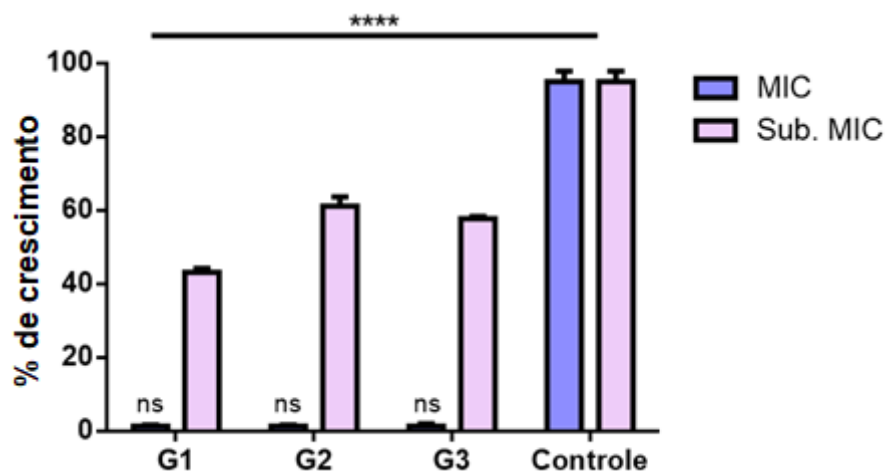


5.4.3. Envolvimento do estresse oxidativo no efeito antibacteriano de Oncocalixona A.

O envolvimento do estresse oxidativo foi investigado indiretamente a partir da utilização do agente antioxidante Ácido L-ascórbico (Vitamina C). Considerando o melhor efeito da substância em estudo contra a linhagem ATCC *S. epidermidis* 12228, esta foi então selecionada para referida investigação. Desta maneira, estabeleceu-se três grupos de tratamento diferenciados, conforme descrito no item 4.7. Todos os grupos foram submetidos a leitura por absorbância em leitor de placas ELISA Plate Reader (Leitora Touch Bioeasy), sob comprimento de onda de 630 nm, estabelecendo assim uma comparação entre os mesmos.

Com os resultados obtidos, verificou-se que o efeito inibitório de Onco A é independente desse estresse, de maneira que tanto na presença do agente antioxidante associado à molécula, como também no grupo pré-tratado com a Vitamina C, a atividade antibacteriana de Onco A para a linhagem utilizada não foi alterada, ou seja, sem diferenças estatísticas na CIM entre os grupos, mantendo assim um valor de 9,43 µg/mL, conforme evidenciado na **Figura 21**.

Figura 21: Participação estresse oxidativo no efeito antibacteriano de Oncocalixona A contra a linhagem *S. epidermidis* ATCC 12228.



Legenda: G1: tratamento com Onco A, G2: tratamento com Onco A + Ácido Ascórbico, G3: pré tratamento com Ácido Ascórbico. Os grupos são comparados entre si na CIM (9,43 µg/mL) e com o grupo controle (sem tratamento), com $p < 0,05$.

5.5. ENSAIO DE BIOCAMPATIBILIDADE

Com o objetivo de se estabelecer a compatibilidade do composto em estudo em um modelo de investigação viável, a atividade hemolítica de Onco A foi avaliada. Neste ensaio, a concentração máxima do composto testada nos ensaios antimicrobianos também foi utilizada, tendo por finalidade verificar se algumas das concentrações que demonstraram efeito antibacteriano inibitório poderia se observar algum dano em eritrócitos humanos. A atividade hemolítica foi determinada através da liberação do conteúdo de hemoglobina, decorrente do dano promovido à membrana dos eritrócitos. Com base nessa observação, Onco A não apresentou atividade hemolítica nas concentrações testadas quando comparada ao controle positivo (Triton-X), o que demonstra a sua biocompatibilidade no modelo de estudo realizado.

6. DISCUSSÃO

Os agentes antimicrobianos são responsáveis por uma contribuição expressiva na clínica médica, no tratamento das enfermidades infecciosas, desde o seu surgimento na metade do século XX, até os dias atuais. Entretanto, a terapia de muitas destas infecções tem se tornado um desafio, decorrente do surgimento da resistência dos MOs a estes agentes inibidores (CHANG et al. 2013). A diversidade de mecanismos genéticos adquiridos por estes seres vivos e que são passíveis de serem transmitidos às células filhas e/ou outras espécies, vem se propagando, de modo silencioso, gerando um grave problema de saúde pública, em todo o mundo (LAXMINARAYAN et al., 2016).

Dada essa problemática, o desenvolvimento de novas opções para o tratamento das doenças infecciosas é urgente e imprescindível, e assim a investigação do potencial antimicrobiano das plantas medicinais e/ou dos seus constituintes é de extrema relevância, servindo como estudos iniciais desse longo caminho a ser percorrido, até a comercialização de um novo antibiótico. Substâncias isoladas obtidas a partir de plantas medicinais destacam-se por permitirem uma melhor averiguação do efeito desejado, sendo assim responsáveis por muitos dos resultados significativos apresentados em estudos anteriores (NAVEED et al., 2013).

O método de microdiluição em caldo, empregado neste estudo, representa um modelo viável, reprodutível e com menor custo, para se determinar a CIM de novos compostos (OSTROSKY et al., 2008). Através deste, os resultados aqui obtidos demonstram que uma benzoquinona isolada do cerne do caule da espécie *Auxemma oncocalyx* Taub, é capaz de inibir o crescimento *in vitro* de importantes espécies bacterianas em concentrações variáveis.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* sp são responsáveis por uma diversidade de problemas médicos, que variam desde infecções localizadas até quadros mais disseminados, com elevada gravidade (GELATTI et al., 2009). Soma-se isso o potencial de resistência antibiótica que muitas das cepas envolvidas nestes quadros infecciosos podem apresentar aos fármacos de escolha e que tem conduzido a necessidade da busca de novas opções terapêuticas. Diante disso, neste estudo, apresenta-se o potencial inibitório considerável de Oncocalixona A (Onco A) contra as principais espécies desse gênero, evidenciando a sua contribuição para o tratamento de infecções provocadas por estas bactérias.

Com a realização dos ensaios de microdiluição, verificou-se que os valores das CIMs de Onco A variaram entre a maior concentração testada (151 µg/mL) até a concentração de 9,43 µg/mL (**Tabela 5 e Figura 14**), resultado este obtido contra a espécie *S. epidermidis* ATCC 12228. A variação nos valores de CIM diante das linhagens bacterianas utilizadas pode ser decorrente da diversidade das espécies avaliadas quanto aos seus fatores de virulência.

Os trabalhos que descrevem a atividade antimicrobiana de benzoquinonas obtidas de produtos naturais são poucos. Contudo, encontra-se ainda estudos que apresentam resultados para estas moléculas, bem como aqueles que demonstrem o efeito de benzoquinonas modificadas quimicamente. A CIM apresentada frente a espécie citada acima, assemelha-se com o valor obtido por Drewes et al. (2005), que demonstraram a atividade antibacteriana de uma benzoquinona extraída de *Gunnera perperna* contra a mesma espécie de *S. epidermidis* da linhagem ATCC 12228, com uma CIM de 9,8 µg/mL.

Observou-se ainda que Onco A também inibiu o crescimento da linhagem *S. aureus* ATCC 29213 (**Figura 14**), uma linhagem resistente à Penicilina, com uma concentração de 18,87 µg/mL, enquanto que no estudo já mencionado, a molécula em análise apresentou CIM de 39 µg/mL frente a linhagem de *S. aureus* ATCC 6538. Ambas as espécies são importantes integrantes do gênero *Staphylococcus* sp e são responsáveis por provocar quadros infecciosos variáveis e muitas vezes estão associados a infecções comunitárias e/ou hospitalares (DREWES et al., 2005).

As naftoquinonas são moléculas estruturalmente semelhantes às benzoquinonas. Rahmoun et al. (2012) analisaram a atividade antibacteriana de oito compostos derivados de uma 2-hidroxi-naftoquinona, sintetizados pela modificação com acetonitrila na posição 4 da molécula original. Os autores observaram que dois deles (P5 e P6) apresentaram atividade contra a espécie *S. aureus* ATCC 25923, com CIMs variando entre 18-32 e 32-64 µg/mL, respectivamente. Além desta, o composto P6 também apresentou efeito contra a espécie *E. faecalis* ATCC 29213. Entretanto, este foi capaz de inibir o crescimento bacteriano com uma concentração bem mais elevada (256 µg/mL), se comparado com a CIM de Onco A frente a esta mesma linhagem bacteriana (75,5 µg/mL).

Uma observação importante foi a capacidade desta benzoquinona em inibir o crescimento da linhagem *E. faecalis* ATCC 51299 com uma concentração de 75,5 µg/mL. Esta trata-se de uma linhagem resistente à vancomicina, conforme

demonstrado no grupo tratado com o referido antibiótico (**Tabela 5**). Comparando estas observações diante dos dois tratamentos (com Onco A e com o antibiótico padrão), destaca-se que a molécula apresenta uma melhor ação contra esta linhagem resistente.

Considerando que o problema da resistência bacteriana é refletido nos altos índices de morbi/mortalidade, principalmente no ambiente hospitalar (SANTOS, 2007), a utilização de isolados clínicos em estudos como este permite determinar o efeito antibacteriano dos compostos em estudos frente a cepas caracteristicamente resistentes. Assim, utilizando espécimes clínicos resistentes à Meticilina (*S. aureus* MED 55 e *S. aureus* COL), demonstrou-se que a molécula em análise apresentou um efeito inibitório considerável no crescimento destas, com concentrações de 18,87 e 37,75 µg/mL, respectivamente. Com isso, o potencial antibacteriano desta benzoquinona como alternativa no desafio da resistência microbiana torna-se ainda mais evidente.

Além da busca por novas moléculas capazes de vencer a resistência aos antibióticos, é importante destacar a necessidade de ações que possam evitar o agravamento do problema. Desta maneira, a implementação de medidas de conscientização dos riscos do uso indiscriminado dos antibióticos bem como de medidas preventivas em geral, podem minimizar a ocorrência de quadros infecciosos provocados por cepas de MRSA (MEJÍA; ZURITA, GUZMÁN-BLANCO, 2010).

Além da atividade contra bactérias dos gêneros *Staphylococcus* sp e *Enterococcus* sp, um resultado considerável foi o efeito de Onco A frente as espécies *Listeria monocytogenes* (CIM = 37,75 µg/mL) e *Streptococcus mutans* (CIM = 75,5 µg/mL). *L. monocytogenes* é uma bactéria ubíqua e devido a esta característica, está associada tanto a quadros de infecções em humanos, como em animais (DUARTE et al., 2019; WALLAND et al., 2015), e relacionada à contaminação no processamento de produtos alimentares (MELERO et al., 2019), conduzindo aos conhecidos quadros de listeriose. Desta maneira, a ocorrência de infecções provocadas por esta espécie bacteriana representa uma preocupação e o efeito inibitório aqui apresentado é de extrema relevância.

A ação apresentada contra *S. mutans* ATCC 25175 também é significativa, tendo em vista que esta é uma importante bactéria da microbiota oral humana. Enquanto que a cárie dentária representa o principal problema provocado por esta espécie, a ação da molécula em estudo é promissora. Trabalhos que apresentem o

potencial de benzoquinonas contra esta espécie bacteriana são escassos. Diante disso, reitera-se que o efeito de Onco A contra a mesma é relevante, inibindo este micro-organismo com CIM de 75,5 µg/mL.

Uma outra consideração importante que enaltece a aplicação de Onco A como molécula promissora no desafio da resistência bacteriana, é o seu efeito contra as linhagens de bactérias Gram negativas, *S. maltophilia* EM0104 e *A. baumannii* ATCC 19606 que apresentaram, respectivamente, CIM de 75,5 e 151 µg/mL. Os dados de inibição observados, desta benzoquinona, sobre o crescimento da cepa de *S. maltophilia* EM0104, uma estirpe obtida de processo infeccioso humano, são promissores desde que este micro-organismo tem se destacado como um patógeno responsável por elevadas taxas de infecções nosocomiais e o tratamento destas torna-se cada vez mais difícil tendo em vista a resistência a antibióticos padrão como imipenem, meropenem, ampicilina, entre outras opções, o que restringem a terapêutica essencialmente a levofloxacina e a sulfametoxazol+trimetoprima (FLORES-TREVIÑO et al., 2014).

Apesar de inibir o crescimento de duas das cinco linhagens de bactérias Gram negativas testadas, a molécula não apresentou efeito contra as linhagens *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Do ponto de vista da classe bacteriana, estes resultados corroboram com os dados demonstrados por Drewes et al. (2005), que constataram que a molécula 2-metil-6-[3-metil-2-butenil] 1,4-benzoquinona também não exerceu efeito contra as espécies de *E. coli* ATCC 11775 e *K. pneumoniae* NCTC 9633.

Além disso, a ausência de atividade de Onco A para a espécie *P. aeruginosa*, também está de acordo com o trabalho de Rahmoun et al. (2012), no qual as moléculas por eles avaliadas não apresentaram atividade para a mesma linhagem bacteriana aqui utilizada. Entretanto, Dias et al. (2018) demonstraram que compostos de naftoquinonas sintetizadas pela adição de grupamentos amino açúcar na molécula, foram efetivos contra as mesmas linhagens de *E. coli* e *P. aeruginosa*, o que sugere que modificações químicas nas moléculas originais de quinonas podem ser responsáveis por uma maior seletividade para estas espécies bacterianas.

Além de determinar a concentração que inibe o crescimento bacteriano, também se calculou a concentração de Onco A que induz 50% do seu efeito máximo nesta inibição (CIM₅₀). Assim, a CIM₅₀ da benzoquinona em estudo apresentou valores de que variam desde 3,79 a 57,22 µg/mL. Diante disso, observa-se que a molécula

inibe, em baixas concentrações, principalmente, o crescimento de bactérias do gênero *Staphylococcus* sp.

Da mesma maneira, Ferreira et al (2018) verificaram a CIM₅₀ do composto estudado por eles contra isolados clínicos da espécie *S. aureus*, e Yang et al (2017) também demonstraram valores de CIM₅₀ para as moléculas derivadas de indolizinoquinolina-5,12-diona modificadas, no tratamento contra linhagens resistentes à metilina. Tendo em vista que bactérias do gênero *Staphylococcus* sp são as principais espécies associadas a importantes quadros infecciosos, os dados obtidos reforçam o potencial de Onco A contra espécies bacterianas de interesse clínico, incluindo tanto linhagens padrão como também espécimes clínicos.

Uma vez determinada a CIM, a CBM foi analisada a fim de se determinar a menor concentração que apresenta efeito letal contra esses micro-organismos. Determinando a CBM é possível analisar se o composto se apresenta como um agente bactericida, possuindo um efeito letal, ou um agente bacteriostático, apenas inibindo o crescimento das espécies (FRENCH, 2006).

Na avaliação da CBM da benzoquinona em estudo, verificou-se que esta foi superior a concentração de 151 µg/mL (concentração inicial do teste de CIM) para a maioria das linhagens utilizadas, evidenciando que são necessárias concentrações acima desta para que a molécula seja capaz de efetivamente matar a bactéria. Desta forma a partir dos resultados obtidos, constatou-se que Onco A possui um efeito bacteriostático contra a maior parte das espécies utilizadas neste estudo, exceto para *S. epidermidis* ATCC 1228, na qual Onco A exerceu um efeito letal na concentração máxima testada, apresentando para esta ação bactericida.

Diante disso, por meio do protocolo experimental da curva de morte foi possível estudar tal efeito, percebendo-se que na concentração em que tem ação letal contra a bactéria citada acima, Onco A já inviabiliza a reprodução da população bacteriana nas horas iniciais de incubação. Com um tempo de incubação de 8 horas a molécula reduz ainda mais o crescimento microbiano, de maneira que após 24 horas a taxa de crescimento é acentuadamente diminuída, conduzindo assim a um efeito letal contra a espécie *S. epidermidis*.

Contudo, cabe ressaltar que apesar de exercer uma ação que resulta na morte bacteriana, a concentração de 151 µg/mL, é uma concentração considerada alta, partindo da premissa de buscar-se novos compostos que sejam capazes de eliminar bactérias em baixas concentrações, bem como que não apresentem efeitos tóxicos a

células humanas. Entretanto, evidencia-se que esta molécula é capaz de matar uma bactéria envolvida em importantes quadros infecciosos.

Diante do efeito bacteriostático na CIM contra todas as linhagens bacterianas utilizadas, observa-se que a molécula exerce apenas ação inibitória do crescimento bacteriano, contudo, o efeito tem relevância se considerarmos que em condições de infecção humana, a capacidade de um agente em controlar a disseminação dos micro-organismos causadores ali presentes, permite que o sistema imune do hospedeiro possa então debelá-lo do organismo a partir de um mecanismo de opsonização (MACHADO et al., 2004; HANSCH, 2012).

Enquanto uma estrutura altamente organizada e complexa, os biofilmes podem ser considerados como um importante fator de virulência das bactérias e dentre estas as do gênero *Staphylococcus* sp e a espécie *S. aureus*, por exemplo, apresenta a capacidade de colonizar e infectar uma diversidade de tecidos e superfícies (OLIVEIRA et al., 2006; JAMIL et al., 2016). Durante a sua formação, a etapa de adesão é importante, permitindo que as bactérias possam se fixar na superfície dos mais diversos materiais através de ligações físico-químicas que constituem o alicerce para o desenvolvimento da massa celular (WATNICK; KOLTER, 2000). Desta forma, inibir essa adesão representa um alvo considerável na avaliação de atividade antibiofilme de novos compostos.

Com base nisso, o efeito de Onco A na inibição da formação dos biofilmes das linhagens *S. epidermidis* 70D e *S. aureus* MED 55 foi investigado. A partir dos resultados obtidos, evidenciou-se que o composto inibiu, aproximadamente, 20% do biofilme formado pela cepa *S. epidermidis* 70D. Entretanto, uma maior significância foi observada no efeito frente ao biofilme formado pela linhagem *S. aureus* MED 55, com um percentual em torno de 70% de inibição (**Figura 15**).

Novais et al. (2018) demonstraram o efeito de quatro derivados de 2-hidroxi-3-fenilsulfanilmetil-[1,4]-naftoquinona na inibição da formação do biofilme da espécie *P. aeruginosa* ATCC 15442, reforçando o potencial antibiofilme de compostos quinônicos. Dentre estes, um apresentou melhor atividade, com 65% de inibição nas concentrações que representaram $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da CIM. Não diferente, Moreira et al. (2016) mostraram que uma arilsulfanilmetil-[1,4]-naftoquinona sintética inibiu em 50%, na concentração sub CIM, a formação do biofilme da linhagem multirresistente de MRSA BMB 9393. Comparando a utilização de linhagens resistentes à metilina utilizadas

nesse estudo, percebe-se que Onco A apresentou um melhor percentual de inibição frente a espécie *S. aureus*.

Considerando a etapa investigada, é possível que o mecanismo envolvido no efeito antibiofilme ocorra a nível de adesão das células à superfície, tendo em vista que neste momento a interação entre as moléculas da superfície bacteriana e as do material ao qual estas aderem, é de extrema importância para a maturação do biofilme. Com isso, compostos obtidos a partir de produtos naturais que se apresentem como alternativas consideráveis na inibição desta comunidade de células são de grande interesse no desenvolvimento de novos agentes antibacterianos (ARAÚJO et al. 2015).

Muitas das infecções fúngicas manifestam-se de forma mais branda. Contudo, alguns processos infecciosos tendem a apresentar lesões características comprometendo a região acometida (TELLES et al, 2017). Enquanto microorganismos responsáveis por importantes processos patológicos, bem como capazes de desenvolver resistência às principais drogas de escolha da terapia, os fungos também representaram um modelo celular de grande interesse na investigação do potencial antimicrobiano de Onco A. Na análise do potencial antifúngico desta molécula, observou-se que a mesma não foi capaz de inibir o crescimento das espécies utilizadas neste estudo (**Tabela 7**).

A ausência de atividade antifúngica de Onco A corrobora com os achados de Rahmoun et al. (2012), os quais também não observaram ação para os derivados de naftoquinonas sintetizados contra as linhagens de *C. albicans* ATCC 4441PP, ATCC 10231, ATCC 26790. No entanto, a benzoquinona estudada por Drewes et al (2005) apresentou atividade contra as linhagens de *C. neoformans* ATCC 90112 e *C. albicans* ATCC 90112, com valores de CIM superiores, se comparados ao controle utilizado (Anfotericina B).

Da mesma forma, no estudo de Castro et al. (2013) demonstrou-se que a modificação do anel benzeno de uma 1,4-naftoquinona por uma substituição prenila, resultou em uma potente atividade antifúngica contra importantes espécies de interesse clínico. A partir disso, percebe-se que as modificações químicas em compostos originais podem ser determinantes para uma seletividade no efeito biológico e assim, conforme o objetivo e/ou necessidade, alterações na molécula original de Onco A poderia atribuir a esta uma possível atividade antifúngica.

Tendo em vista o efeito antibacteriano inibitório da Onco A observado, utilizou-se de protocolos experimentais que pudessem explicar de que maneira a molécula apresentaria tais efeitos. Com isso, empregou-se a análise de possíveis alterações morfológicas, após o tratamento, bem como o envolvimento da produção de espécies reativas de oxigênio.

Na análise por MFA foi possível observar importantes alterações na morfologia das linhagens bacterianas de *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. maltophilia* EM0104 e *S. epidermidis* ATCC 12228. Estas alterações corresponderam aos parâmetros de tamanho e rugosidade média, a qual permitiu avaliar as modificações ocorridas na superfície das bactérias submetidas ao tratamento *in vitro* com Onco A. Tais observações foram analisadas em relação ao controle, tanto em análise visual (**Figuras 17, 18 e 19**) como também em uma análise quantitativa (**Figura 20**), nos tratamentos com as concentrações sub - CIM da molécula.

Considerando que a síntese de proteínas estruturalmente funcionais é importante para a manutenção da morfologia bacteriana, sugere-se que as alterações morfológicas após o tratamento com Onco A, possam estar associadas com uma possível ação a nível de síntese proteica, que comprometem o metabolismo bacteriano e, desta forma, conduzem às modificações visualizadas, explicando o efeito bacteriostático observado na determinação da Concentração Bactericida Mínima (FRENCH, 2006).

Cabe ressaltar que diante dos dois modelos bacterianos analisados (Gram positivos [*L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. epidermidis* ATCC 12228] e Gram negativo [*S. maltophilia* EM0104]) as alterações nos dois parâmetros foram semelhantes, demonstrando que Onco A possa exercer sua ação por um mecanismo comum frente às linhagens utilizadas. Contudo, mais estudos são necessários, incluindo os que avaliem o conteúdo proteico bacteriano após o tratamento, bem como estudos moleculares, que possam elucidar o mecanismo de ação pelo qual a molécula apresenta este efeito contra as linhagens bacterianas utilizadas. Além disso, pesquisas com abordagem *in silico* também são alternativas consideráveis para explicar esta ação.

A literatura reporta um comportamento dual de moléculas nas quais Onco A se enquadra. Segundo Skulachev et al. (2009), as quinonas podem se apresentar como agentes pró-oxidantes e/ou antioxidantes, em diferentes sistemas. Além disso, a relação existente entre o estresse oxidativo e uma ação antimicrobiana tem sido

avaliada por diferentes estudos, de maneira que este quando envolvido pode interferir na ação de agentes antibacterianos (ZHAO; DRLICA, 2014).

Diante disso, como estudo do efeito antibacteriano da benzoquinona em questão, buscou-se investigar um possível envolvimento das espécies reativas de oxigênio nesta atividade, dada esta dualidade exibida por substâncias desta classe. Para isso, selecionou-se a espécie bacteriana mais sensível a ação de Onco A (*S. epidermidis* ATCC 12228 com CIM de 9,43 µg/mL).

O estabelecimento de diferentes grupos de tratamento, permitiu avaliar esta possível participação em três momentos caracterizados pelo efeito de Onco A sozinha (G1), Onco A associada ao ácido ascórbico em uma mesma solução (G2), bem como um grupo pré - tratado com inibidor da via do estresse oxidativo (G3). O possível envolvimento desta via comprometeria os valores de CIM da molécula para a espécie selecionada, nos grupos submetidos à presença do ácido ascórbico.

Os resultados obtidos demonstraram que o efeito apresentado pela benzoquinona não tem participação do estresse oxidativo, de maneira que na CIM não se observa diferenças estatisticamente significativas na CIM, entre os três grupos estabelecidos (**Figura 20**). Os dados obtidos corroboram e reforçam o efeito bacteriostático de Onco A na sua CIM contra a espécie utilizada. Os achados evidenciam que nesta concentração a molécula inibe o crescimento bacteriano e que isto é independente da produção de EROS, uma vez que na presença destas espécies reativas o efeito culminaria em uma ação letal. Contudo, conforme observado na determinação da CBM, esta ação só ocorre na máxima concentração de Onco A utilizada.

No desenvolvimento de novas drogas, a biocompatibilidade de novos compostos é um parâmetro importante a ser avaliado. Assim, a compatibilidade de Onco A com eritrócitos humanos também foi analisada e com isso foi possível observar que, nas concentrações testadas, a molécula não apresentou nenhum efeito hemolítico. O resultado obtido corrobora com os achados de Sbardelotto (2013) que demonstrou que Onco A apresenta um potencial hemolítico em concentração superior (191 µg/mL) à concentração testada neste estudo (151 µg/mL). Além disso, o efeito encontrado também está de acordo com o apresentado por Novais et al. (2018) na análise da hemocompatibilidade dos seus compostos.

A biocompatibilidade de Onco A também foi avaliada contra a linhagem de fibroblastos da pele (CCD922) e apresentou CI_{50} de 13 µg/mL (PESSOA et al., 2000).

Entretanto, a molécula se mostrou como um composto não genotóxico no modelo de estudo realizado por Pessoa et al (2003). Analisando os valores CIM₅₀ (**Tabela 6**) obtidos para as linhagens bacterianas aqui utilizadas, observa-se que em concentrações menores que a citada anteriormente (13 µg/mL), Onco A apresenta efeito contra bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. Esta observação, aliada a hemocompatibilidade aqui apresentada, avigora o potencial para aplicação terapêutico de Oncocalixona A.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* sp estão entre as mais envolvidas em quadros de infecções de pele. O efeito de Onco A contra as linhagens bacterianas deste gênero demonstram um perfil antibacteriano promissor contra tais espécies, servindo assim como uma alternativa no desenvolvimento de novas opções terapêuticas de aplicação tópica, por exemplo, que visem o tratamento de quadros infecciosos provocados por elas.

Cabe ressaltar que, embora a molécula tenha sido apresentada com atividade tóxica em diferentes modelos de estudos (PESSOA et al, 2000; COSTA-LOTUFO et al., 2002; LEIVA-REVILLA et al., 2016; 2017) os resultados aqui obtidos demonstram seu efeito frente a células procariontes, que ainda não havia sido demonstrado. Diante de estudos que demonstram uma ação antibacteriana de quinonas modificadas quimicamente (NOVAIS et al., 2018; DIAS et al., 2018; KURBAN et al., 2019) e do efeito promissor de Onco A, para uma aplicação terapêutica futura com menor toxicidade contra células eucariontes e melhor atividade antibacteriana, sugere-se que possíveis modificações na estrutura química desta molécula possam reforçar e assegurar o seu potencial antibacteriano e sua segurança frente a células humanas.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que Onco A, uma molécula isolada de um produto natural é capaz de exercer ação, por efeito bacteriostático, contra importantes espécies de bactérias Gram positivas e duas bactérias Gram negativas, sendo uma delas isolado clínico. O composto mostrou-se capaz de inibir a formação inicial do biofilme de uma linhagem bacteriana de interesse clínico, bem como mostrou-se biocompatível nas mesmas concentrações que mostrou atividade antibacteriana. Em contrapartida, constatou-se que Onco A, não possui atividade antifúngica. No estudo do efeito antibacteriano, sugerimos que possivelmente este possa estar relacionado com a síntese proteica, uma vez que alterações consideráveis na morfologia bacteriana foram observadas nas análises por MFA. Além disso, verificamos ainda que embora as quinonas possam apresentar um comportamento dual no que diz respeito a produção de radicais livres, Oncocalixona A possui seu efeito antibacteriano de maneira independente desta produção.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, I.; JOSHI, R.; PARDASANI, P.; PARDASANI, R. T. Recent Advances in 1,4-Benzoquinone Chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 3, p. 385-421, 2011.
- ABRAHAM, W.R. Going beyond the control of quorum sensing to combat biofilm infections. **Antibiotics** (Basel) 5, 1–16, 2016.
- AL-BAKRI, A. G.; AFIFI, F. U. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. **Journal of Microbiological Methods**. v. 68, p. 19-25, 2007.
- AHMED, E.; ARSHAD, M.; KHAN, M. Z.; AMJAD, M. S.; SADAF, H. M.; RIAZ, I.; SABIR, S.; AHMAD, N.; SABAOON. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 2, p. 205-214, 2017.
- ANANTH, D. A.; TIETELA, Z.; ASEERVATHAM, G. S. B.; GARLAPATIC, D.; SIVASUDHA, T. Phytochemical and pharmacological status of indigenous medicinal plant *Pedaliium murex* L.- A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 103. p. 1456–1463, 2018.
- ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V. C.; HAAS, V. J. Occurrence of Multi-Resistant Bacteria in the Intensive Care unit of a Brazilian Hospital of Emergencies. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2006.
- ARAÚJO, A. R.; QUELEMES, P. V.; PERFEITO, M. L. G.; LIMA, L. I.; SÁ, M. C.; NUNES, P. H. M.; JOANITTI, G. A.; EATON, P.; SOARES, M. J. S.; LEITE, J. R. S. A. 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.
- ARAÚJO, A. R.; ILES, B. NOGUEIRA, K. M.; DIAS, J. N.; PLÁCIDO, A.; RODRIGUES, A.; ALBUQUERQUE, P.; SILVA-PEREIRA, I.; SOCODATTO, R.; PORTUGAL, C. C.; BELVAS, J. B.; VÉRAS, L. M. C.; LIMA, F. C. D. A.; BATAGINETO, A.; MEDEIROS, J. V. R.; NUNES, P. H. M.; EATON, P.; LEITE, J. R. S. A. Antifungal and anti-inflammatory potential of eschweilenol C-rich fraction derived from *Terminalia fagifolia* Mart. **Journal of ethnopharmacology**, v. 240, p. 111941, 2019.
- ARAÚJO, Isabella Santos. **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS AROMÁTICAS QUE OCORREM NO ESTADO DO PARÁ**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.
- ARRUDA, Mariana Oliveira. **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE PRODUTOS NATURAIS SOBRE PATÓGENOS RESPIRATÓRIOS**. 2016. 114 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE. Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2016.

- BARRETO, A. C. H.; SANTIAGO, V. R.; FREIRE, R. M.; MAZZETTO, S. E.; DENARDIN, J. C.; MELE, G.; CAVALCANTE, I. M.; RIBEIRO, M. E. N. P.; RICARDO, N. M. P. S.; GONÇALVES, T.; CARBONE, L.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; FECHINE, P. B. A. Magnetic Nanosystem for Cancer Therapy Using Oncocalyxone A, an Antitumour Secondary Metabolite Isolated from a Brazilian Plant. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, n. 9, p. 18269-18283, 2013.
- BAYEN, S.; BAROOAH, N.; SHARMA, R. J.; SEN, T. K.; KARMAKAR, A.; BARUKH, J. B. Synthesis, structure and electrochemical properties of 2,5 bis (alkyl/anylamino) 1,4-benzoquinones and 2-anylamino-1,4-naphthoquinones. **Dyes and Pigments**, v. 75, n. 3, p. 770-775, 2007.
- BECEIRO, Alejandro; TOMÁS, María; BOU, Germán. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 2, p. 185-230, 2013.
- BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. NEW ANTIFUNGIC DRUGS: A REVIEW. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159 -172, 2004.
- LE, Tao et al. **First aid for the USMLE step 1 2015**. McGraw-Hill Medical, 2015.
- BOGINO, P. C.; OLIVA, M. M; SORROCHE, F. G. GIORDANO, W. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 15838-15859, 2013.
- BRAGA, Renato. **Plantas do Nordeste: especialmente do Ceará**. 5ª ed. Mossoró: ESAM, p. 495, 2001.
- BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos. 416 p. 2010.
- CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 5, n. 11, p. 26-32, 2007.
- CASTILHO, A. L.; SILVA, J. P. C.; SARACENI, C. H. C.; DÍAZ, I. E. C.; PACIENCIA M. L. B.; VARELLA, A. D.; SUFFREDINI, I. B. In vitro activity of Amazon plant extracts against *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 769-779, 2014.
- CASTRO, M. A.; GAMITO, A. M.; TANGARIFE-CASTAÑO, V.; ZAPATA, B.; CORRAL, J. M. M. D.; MESA-ARANGO, A. C.; BETANCUR-GALVIS, L.; FELICIANO, A. S. Synthesis and antifungal activity of terpenyl-1,4-naphthoquinone and 1,4-anthracenedione derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 19-27, 2013.
- CHANG, R. L.; CHO, I. H.; JEONG, B. C.; LEE, S. H. Strategies to minimize antibiotic resistance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 10, n. 9, p. 4274-4305, 2013.

CHATURVEDI, D. Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities, In: opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry, **Research Signpost, Trivandrum**, p. 313-334, 2011.

CLONTS, L. Como evitar a formação de biofilmes. **Revista Controle de Contaminação**, São Paulo, v. 109, p. 50-56, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 29th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2019.

COLOMBO, A. L., MATTA, D.; ALMEIDA, L.P.; ROSA, R. Fluconazole susceptibility of brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.6, n. 3, p. 118-23. 2002.

COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica**. Macapá, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

COSTA, C. O.; COSTA, E. O.; FERREIRA, F. R.; VIANA, L.S.; SILVA, L.V.; SILVA, F. A. Z.; ABREU, F.C.; FIGUEIREDO, I. M.; PINHO JR, W.; BENTO, E. S.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; AGUILERA-VENEGAS, B.; NORAMBUENA, E.; OLEAZARD, C.; GOULART, M. O. F. Oncocalyxone A: Electrochemical, Spectroscopic Investigation and Studies of Its Interaction with DNA, Nucleobases and *N*-Acetylcysteine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 6, p. 1174-1185, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V.; FERREIRA, M. A. D.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, G. M. A. Toxicity to sea urchin egg development of the quinone fraction obtained from *Auxemma oncocalyx*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 927-930, 2002.

CURSINO, L.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Synergic interaction between ascorbic acid and antibiotics against *Pseudomonas*

aeruginosa. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 379-384, 2005.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

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.

DEMAIN, A. L. Indiolites from microorganisms: a brilliant past, a bright future. 2000.

DEMITTO, F. O.; AMARAL, R. C. R.; BIASI, R. P.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BAEZA, L. C. Suscetibilidade a antifungos *in vitro* de *Candida spp.* em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 5, p. 315-321, 2012.

DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 11, p. 1445-57, 2003.

DERLON, N.; MASSÉ, A.; ESCUDIÉ, R.; BERNET, N.; PAUL, E. Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. **Water research**, v. 42, n. 8-9, p. 2102-2110, 2008.

DIAS, F. R. F.; NOVAIS, J. S.; DEVILLART, T. A. N. S.; SILVA, W. A.; FERREIRA, M. O.; LOUREIRO, R. S.; CAMPOS, V. R.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V.; CASTRO, H. C.; CUNHA, A. C. Synthesis and antimicrobial evaluation of amino sugar-based naphthoquinones and isoquinoline-5,8-diones and their halogenated compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 156, p. 1-12, 2018.

DIAZ, M. A. N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, D. M.; RIBON, A. O. B.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 724-728, 2010.

DIGNANI, M. C.; SOLOMKIN, J. S.; ANAISSIE, E. *Candida*. In: ANAISSIE, E.; GINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. (Eds.). **Medical Mycology**. 1ª ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p.195-239, 2003.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DREWES, S. E.; KHAN, F.; VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. Simple 1,4-benzoquinones with antibacterial activity from stems and leaves of *Gunnera perpensa*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1812-1816, 2005.

DUARTE, F.; PINTO, S. M.; TRIGO, A. C.; GUIMARAES, F.; PEREIRA, R.; NENO, M.; ABREU, R. C.; NEVES, I. A rare presentation of *Listeria monocytogenes* infection: Perianal abscess associated with lumbar spine osteitis. **IDCases**, v. 15, p. e00488, 2019.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305–311, 2005.

ETEBU, E.; ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. **International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research**, v. 4, p. 90-101, 2016.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**. v. 6, p. 25–64, 2014.

FERRAREZE, M. V. G.; LEOPOLDO, V. C.; ANDRADE, D.; SILVA, M. F. I.; HAAS, V. J. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among patients from an intensive care unit: persistent challenge?. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 1, p. 7-11, 2007.

FERREIRA, M. A. D.; NASCIMENTO, N. R. F.; SOUSA, C. M.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G.; VENTURA, J. S.; SCHATNER, M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Oncocalyxone A inhibits human platelet aggregation by increasing cGMP and by binding to GP Iba glycoprotein. **British Journal of Pharmacology**. v. 154, p. 1216–1224, 2008.

FERREIRA, M. A. D.; NUNES, O. D. R. H.; FONTENELE, J. B.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Phytomedicine**, v. 11, p. 315–322, 2004.

FERREIRA, M. A. D.; NUNES, O. D. R. H.; FUJIMURA, A. H. Y.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. Inhibition of platelet activation by quinones isolated from *Auxemma oncocalyx* Taub. **Research communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 106, p. 97-107, 1999.

FERREIRA, M. A. D.; NUNES, O. D. R. H.; LEAL, L. K. A. M.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. C. B. Antioxidant Effects in the Quinone Fraction from *Auxemma oncocalyx* TAUB. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 5, p. 595-599, 2003.

FERRO, D. **Fitorerapia**: conceitos clínicos. São Paulo: Atheneu, 2006. 502 p.

FIESER, L. F.; FIESER, M. Organic Chemistry, 3rd ed., D. C. **Heath & Comp.**: Boston, 1956.

FOSTER, Timothy J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 3, p. 430-449, 2017.

FLORES-TREVIÑO, S.; GUTIÉRREZ-FERMAN, J. L.; MORFÍN-OTERO, R.; RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; ESTRADA-RIVADENEYRA, D.; RIVAS-MORALES, C.; LLACA-DÍAZ, J. M.; CAMACHO-ORTÍZ, A.; MENDOZA-OLAZARÁ, S.; GARZA-GONZÁLEZ, E. *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance,

biofilm formation and clonal diversity. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 1524-1530, 2014.

FRENCH, G. L. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections - the potential role of daptomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 58, p. 1107-1117, 2006.

FREY-KLETT, P.; BURLINSON, P.; DEVEAU, A; BARRET, M.; TARKKA; M.; SARNIGUET, A. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 4, p. 583-609, 2011.

FRIEDMAN, N. D.; TEMKIN, E.; CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 416-422, 2016.

FRIERI, M.; KUMARB, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369-378, 2017.

GABARDI, S. MARTIN, S.; SURA, M.; MOHAMMED, A.; GOLAN, Y. Miconazole treatment and eradication of candiduria among hospitalized patients. **International Urology and Nephrology**, v. 48, n. 11, p. 1881-1885, 2016.

GARCIA-LAFUENTE, A.; GUILLAMON, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTINEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, n. 9, p. 537-552, 2009.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, 2008.

GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; D'AVEZEDO, P. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: emerging community dissemination. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501-506, 2009.

GOTTSCHLING, M.; MILLER, J. S. Clarification of the taxonomic position of *Auxemma patagonula* and *Saccolium* (Cordiaceae, Boraginales). **Systematic Botany**, v. 31, n. 2, p. 361-367, 2006.

GUIMARÃES, A. C.; DONALISIO, M. R.; SANTIAGO, T. H. R.; FREIRE, J. B. Óbitos associados à infecção hospitalar, ocorridos em um hospital geral de Sumaré-SP, Brasil. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, n. 5, p. 864-869, 2011.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. ANTIBIÓTICOS: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, E.; VILELLA, T. A. S; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÉGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n. 4, p. 394-398, 2008.

HÖFLING-LIMA, A. L.; FORSETO, A.; DUPRAT, J. P.; ANDRADE, A.; SOUZA, L. B.; GODOY, P.; FREITAS, D. Laboratory study of the mycotic infectious eye diseases and factors associated with keratitis. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v. 68, n. 1, p. 21-27, 2005.

HUIJBERS, P.; BLAAK, H.; JONG, M. C. M.; GRAAT, E. A. M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E.; HUSMAN, A. M. R. Role of the environment in the transmission of antimicrobial resistance to humans: a review. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 20, p. 11993-12004, 2015.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). Antibiotic resistance: implications for global health and novel intervention strategies: work- shop summary. Washington, DC: **The National Academies Press**, 2010.

JAMIL, B.; HABIB, H.; ABBASI, S. A.; IHSAN, A.; NASIR, H.; IMRAN, M. Development of cefotaxime impregnated chitosan as nano-antibiotics: De novo strategy to combat biofilm forming multi-drug resistant pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 330, 2016.

JIN, S; SATO, N. Benzoquinone, the substance essential for antibacterial activity in aqueous extracts from succulent young shoots of the pear *Pyrus* spp. **Phytochemistry**, v. 62, p. 101-107, 2003.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN. A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300, 2017.

KASKA, A.; DENIZ, N.; ÇIÇEK, M.; MAMMADOV, R. Evaluation of Antioxidant Properties, Phenolic Compounds, Anthelmintic, and Cytotoxic Activities of Various Extracts Isolated from *Nepeta cadmea*: An Endemic Plant for Turkey. **Journal of Food Science**. v. 83, n. 6, 2018.

KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOSÉ, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 52, n. 2, p.123-127, 2006.

KOKARE, C. R.; CHAKRABORTY, S.; KHOPADE, A. N.; MAHADIK, K. R. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 159-168, 2009.

KURBAN, S.; DENIZ, N. G., SAYIL, C.; OZYUREK, M.; GUCLU, K.; STASEVYCH, M.; ZVARYCH, V.; KOMAROVSKA-POROKHNYAVET, O.; NOVIKOV, V. Synthesis, Antimicrobial Properties, and Inhibition of Catalase Activity of 1, 4-Naphtho-and Benzoquinone Derivatives Containing N-, S-, O-Substituted. **Heteroatom Chemistry**, v. 2019, 2019.

LAXMINARAYAN, R; MATSOSO, P.; PANT, S.; BROWER, C.; RØTTINGEN, J.; KLUGMAN, K.; DAVIES, S. Access to effective antimicrobials: A worldwide challenge. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 168–175, 2016.

LE, K. Y.; OTTO, M. Quorum-sensing regulation in staphylococci – an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 1174, 2015.

LEIVA-REVILLA, J; CADENAS, J; VIEIRA, L. A.; CAMPELLO, C. C.; CELESTINO, J. J. H.; PESSOA, O. D. L.; APGAR, G. A.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; MASIDE, C. Toxicity effect of *Auxemma oncocalyx* fraction and its active principle oncocalyxone A on *in vitro* culture of caprine secondary follicles and *in vitro* oocyte maturation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 1361-1374, 2017.

LEIVA-REVILLA, J; LIMA, L.F.; CASTRO, S.V.; CAMPELLO, C.C.; ARAÚJO, V.R.; CELESTINO, J.J.H.; PESSOA, O.D.L.; SILVEIRA, E.R.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Fraction of *Auxemma oncocalyx* and Oncocalyxone A Affects the In Vitro Survival and Development of Caprine Preantral Follicles Enclosed in Ovarian Cortical Tissue. **Forsch Komplementmed**. v. 23, p. 307-313, 2016.

LI, Yung-Hua; TIAN, Xiaolin. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 2519-2538, 2012.

LIMA, G. R. M.; MACHADO, F. D. F.; PÉRICO, L. L.; FARIA, F. M.; LUIZ-FERREIRA, A.; BRITO, A. R. M. S.; PELLIZZON, C. H.; HIRUMA-LIMA, C. A.; TAVARES, J. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Anti-inflammatory intestinal activity of *Combretum duarceanum* Cambess. in trinitrobenzene sulfonic acid colitis model. **World Journal of Gastroenterology**. v. 23, n. 8, p. 1353-1366, 2017.

LEWIS, R. E. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 8, p. 805-817, 2011.

LIMA, G. R. M.; MONTENEGRO, C. A.; FALCÃO, H. S.; JESUS, N. Z. T.; CABRAL, A. G. S.; GOMES, I. F.; AGRA, M. F.; TAVARES, J. F.; BATISTA, L. M. Gastroprotective activity of the ethanolic extract and hexane phase of *Combretum duarceanum* Cambess (Combretaceae). **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 492-502, 2013.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J. P.; MARQUEZ, B, NEUVILLE, L; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**., v.105. 137–147, 2006.

LUEPKE, K. H.; SUDA, K. J.; BOUCHER, H.; RUSSO, R. L.; BONNEY, M. W.; HUNT, T. D.; MOHR, J. F. Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. **Pharmacotherapy**., v. 37, n. 1, p. 71-84, 2017.

LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 415-428, 2008.

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

MALTA, Valéria Rodrigues dos Santos. **Estudo cristalográfico de naftoquinonas e seus derivados e cálculos teóricos de propriedades relevantes na relação**

- estrutura-atividade**. 2000. Tese (Doutorado em Físico-Química) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.
- MARINHO-FILHO, José Delano Barreto. **Participação das vias atm/atr e c-myc/gsh nos efeitos antitumorais da cordiaquinona J induzidos pelo estresse oxidativo**. 2012. Tese (Doutorado em Farmacologia). Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2012.
- MARQUES, S.C.; REZENDE, J. G. O.S.; ALVES, L. A. F.; SILVA, B. C.; ALVES, E.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R. H. FORMATION OF BIOFILMS BY *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 538-543, 2007.
- LIU, J.; CHEN, D.; PETERS, B. M.; LIN L.; LI, B.; XU, Z.; SHIRLIF, M. E. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 101, p. 56-67, 2016.
- MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet Infectious Diseases**, v. 351, p. 797-799, 1998.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**. v. 166, p. 369-383, 2008.
- MEJÍA, C.; ZURITA, J.; GUZMÁN-BLANCO, M. Epidemiologia e vigilância de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 79-86, 2010.
- MELERO, B.; STESSL, B.; MANSO, B.; WAGNER, M.; ESTEBAN-CARBONERO, O. J.; HERNÁNDEZ, M.; ROVIRA, J.; RODRIGUEZ-LÁZARO, D. *Listeria monocytogenes* colonization in a newly established dairy processing facility. **International Journal of Food Microbiology**. v. 289, p. 64-71, 2019.
- MELO, I. S. V.; SANTOS, A. F.; LEMOS, T. L.G; GOULART, M. O. F.; SANTANA, A. E. G. Oncocalyxone A Functions As an Anti-Glycation Agent In Vitro. **PLOS ONE**, 2015.
- MILLER, S. I. Antibiotic Resistance and Regulation of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Barrier by Host Innate Immune Molecules. **MBio**, v. 7, n. 5, 2016.
- MONKS, T. J.; HANZLIK, R. P.; COHEN, G. M.; ROSS, D.; GRAHAM, D. G.; Quinone Chemistry and Toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 112, p. 2-16, 1992.
- MOREIRA, L. S.; DORIA, A. C. O. C.; SANTOS, T. B.; FIGUEIRA, F. R.; SORGE, D. P. C.; SILVA, A. M.; KHOURI, S. Study of resistance to antifungal agents by yeasts isolated from candidiasis at a medium-sized hospital. **Revista Univap**, v. 23, n. 43, 2017.
- MOREIRA, C. S.; SILVA, A. C. J. A.; NOVAIS, J. S.; FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; CASTRO, H. C. Searching for a potential antibacterial lead structure against bacterial biofilms among new naphthoquinone compounds. **Journal of Applied Microbiology**. v. 122, p. 651-662, 2016.

- MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLOS BIOLOGY**. v. 5, n. 11, p. 307, 2007.
- MOSTERT, S.; PETZER, A.; PETZER J.P. The evaluation of 1,4-benzoquinones as inhibitors of human monoamine oxidase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 135, p. 196-203, 2017.
- MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
- MUKHERJEE, P. K.; LEIDICH, S. D.; ISHAM, N.; LEITNER, I.; RYDER, N. S.; GHANNOUM, M. A. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 82-86, 2003.
- NAZ, R.; AYUB, H.; NAWAZ, S.; ISLAM, Z. U.; YASMIN, T.; BANO, A.; WAKEEL A.; ZIA, S.; ROBERTS, T. H. Antimicrobial activity, toxicity and anti-inflammatory potential of methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 17, p. 302, 2017.
- NAVEED, R.; HUSSAIN, I.; TAWAB, A.; TARIQ, M.; RAHMAN, M.; HAMEED, S.; MAHMOOD, M. S.; SIDDIQUE, A. B.; IQBAL, M. Antimicrobial activity of the bioactive components of essential oils from Pakistani spices against *Salmonella* and other multi-drug resistant bacteria. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 265, 2013.
- NETT, J. E., ANDES, D. R. Antifungal Agents Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 51-83, 2015.
- NOVAIS, J. S.; MOREIRA, C. S.; SILVA, A. C. J. A.; LOUREIRO, R. S.; FIGUEIREDO, A. M. S.; FERREIRA, V. F.; CASTRO, H. C.; ROCHA, D. R. Antibacterial naphthoquinone derivatives targeting resistant strain Gram negative bacteria in biofilms. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 105-114, 2018.
- O'BRIEN, P. J. Molecular Mechanisms of Quinone Cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 80, n. 1, p. 1-41, 1991.
- O'NEILL, J. on behalf of the Review on Antimicrobial Resistance. **Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations**. London: **Review on Antimicrobial Resistance**, 2016.
- OGUNTIBEJU, O. O. Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of Africa. **Journal of Inflammation Research**, v. 11, p. 307–317. 2018.
- OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S. F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L. M.; BERNARDO, F.; VILELA, C. L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**. v, 118, p. 133-140, 2006.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas tóxicas: Conhecimento e Prevenção de Acidentes**. Ribeirão Preto: Holos, 64 p. 2003.

OSÓRIO, Thaís Moreira. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CHALCONAS E HIDRAZONAS FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina. 2011. 107 f. Dissertação [Mestrado]. Universidade Federal de Santa Catarina. 2011.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
PADRÃO, MC. et. al.; Prevalence of nosocomial infection in intensive care Unit, **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 8, n. 2, p. 125-128, 2010.

PANGAL, A.; AHMED, K.; SHAIKH, S. Synthesis, Characterization and Study of Antimicrobial Activity of 2, 6-Ditertiary Butyl-1, 4-Benzoquinone Hydrazones. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 8, p. 172-176, 2013.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, ECS; KRIEG, N. R. Microbiologia; conceitos e aplicações. São Paulo: Pearson Makron Books, 2007

PEREIRA, A. N.; PITA, J. R. ALEXANDER FLEMING (1881-1955): Da descoberta da penicilina (1928) ao Prêmio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras História**, vol. 6, p. 129-151. 2005.

PERES, N. T. A.; MARANHÃO, F. C. A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.

PESSINI, G. L.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1115-1120, 2003.

PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G. Allantoin and fatty acid composition in *Auxemma oncocalyx*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 78, p. 9-10, 1997.

PESSOA, C.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; MORAES, M. O.; VASCONCELLOS, D.; COSTA-LOTUFO, L. V.; LEYVA, A. Cytotoxicity of derivatives of oncocalyxone A from *Auxemma oncocalyx* Taub. **ARKIVOC**, p. 89-94, 2004.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; LEMOS, T. L. G.; WETMORE, L. A.; MORAES, M. O.; LEYVA, A. Antiproliferative Effects of Compounds Derived from Plants of Northeast Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 187-191, 2000.

PESSOA, C.; VIEIRA, F. M. A. C.; LEMOS, T. G.; MORAES, M. O.; LIMA, P. D. L.; RABENHORST, S. H. B.; LEYVA, A.; BURBANO, R. R. Oncocalyxone A From *Auxemma oncocalyx* Lacks Genotoxic Activity in Phytohemagglutinin-Stimulated

Lymphocytes. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement**, v. 1, p. 215-220, 2003.

PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. *Cordiachromes from *Auxemma oncocalyx**. **Phytochemistry**, v. 6, p.1777-1786, 1995.

PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R. Novel Cordiachromes Isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Natural Product Letters**, v.2, p.145, 1993.

PIDDOCK, L. J. The crisis of no new antibiotics what is the way forward **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 249-253, 2012.

PLUIM, T.; HALASA, N.; PHILLIPS, S. E.; FLEMING, G. The Morbidity and Mortality of Patients with Fungal Infections Before and During Extracorporeal Membrane Oxygenation Support. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 13, n. 5, p. 288–293, 2012.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 7, p. 309-318, 2015.

RAHMOUN, NM; BOUCHERIT-OTMANI, Z; BOUCHERIT, K; BENABDALLAH, M; VILLEMIN, D; CHOUKCHOU-BRAHAM, N. Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. **Médecine et Maladies Infectieuses**. v. 42, p. 270-275, 2012.

RANG & DALE: Farmacologia / Rang H. P., et al; [Tradução de Tatiana Ferreira Robaina, et al] – Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 768 p.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, 1720-1731, 2011.

RATTI, R. P.; SOUSA, C. P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 137-143, 2009.

RIBEIRO, S. M., FELÍCIO, M. R., BOAS, E. V., GONCALVES, S., COSTA, F. F., SAMY, R. P., SANTOS, N. C.; FRANCO, O.L. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 160, p. 133–144, 2016.

ROZATTO, Mariana Rodrigues. **DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DE EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Arrabidaea brachypoda***. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2012.

SABER H.; JASNI, A. S.; MAZTURA, T. Z.; JAMALUDDIN, T.; IBRAHIM, R. A Review of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCCmec) Types in

Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS) Species. **The Malaysian Journal of Medical Sciences**, v.24, n. 5, p. 7-18, 2017.

SALMON-CHEMIN, L.; BUISINE, E.; YARDLEY, V.; KOHLER, S.; DEBREU, M. A.; LANDRY, V.; SERGHERAERT, C.; CROFT, S. L.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; DAVIOUD-CHARVET, E. 2-and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, 548. 2001.

SAHARIAH, P.; BENEDIKTSSDOÍTTIR, B. E.; HJAÍLMARSDOÍTTIR, M.; SIGURJONSSON, O. E.; SØRENSEN, K. K.; THYGESEN, M. B., et al. (2015). Impact of chain length on antibacterial activity and hemocompatibility of quaternary N-Alkyl and N,N-dialkyl chitosan derivatives. **Biomacromolecules**, 16, 1449–1460.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C., FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SBARDELOTTO, Aline Borba. **Estudo do mecanismo de citotoxicidade da Oncocalixona-A em leucemia promielocítica humana – linhagem HJ-60**. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2013.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. G.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 642 p. 2009.

SCHELZ, Z. M. J.; HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Phytotherapy**. v. 77, p. 279-285, 2006.

SCHNEIDER, R. P. Biofilms Microbianos. **Microbiologia em Foco**, n. 2, v.1, p-4-12, 2007.

SCORZONI, L.; DE PAULA E SILVA, A. C. A.; MARCOS, C. M., ASSATO, P. A.; MELO, W. C. M. A.; OLIVEIRA, H. C.; COSTA-ORLANDI, C. B.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, n. 36, 2017.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIC, D.; DACKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

SIDRIM, J.; ROCHA, M. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.

SILVA JÚNIOR, A. A. **Essentia herba: plantas bioativas**. Florianópolis: Epagri, v.1, 441 p., 2003.

SILVA, M. T. Classical labeling of bacterial pathogens according to their lifestyle in the host: inconsistencies and alternatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 71, 2012.

SILVA, Nathália Cristina Cirone. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2010.

SIMONETTI, E.; ETHUR, M. E.; CASTRO, L. C.; KAUFFMANN, C.; GIACOMIN, A. C.; LEDUR, A.; AROSSI, K.1; PACHECO, L. A.; GOETTERT, M.I.; FALEIRO, D.; FREITAS, E.M. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, p. 9-18, 2016.

SIVASANKAR, C.; GAYATHRI, Z.; BHASKAR J. P.; KRISHNAN, V.; PANDIAN, S. K. Evaluation of selected Indian medicinal plants for antagonistic potential against *Malassezia* spp. and the synergistic effect of embelin in combination with ketoconazole. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 66-72, 2017.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS GERAIS DAS PLANTAS MEDICINAIS. **Infarma**, v. 16, p. 13-14, 2005.

SMITH, A. W. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1539-1550, 2005.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 223-229, 2013.

SOUSA, Eliane Teixeira. **Quinonas no ar atmosférico. Determinação, concentrações e correlações entre as fases vapor e particulada**. 2012. 117 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 2012.

SULISTYANI, H.; FUJITA, M.; MIYAKAWA, F.; NAKAZAWA, F. Effect of roselle calyx extract on in vitro viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v 9, n. 2, p. 119-124, 2016.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 3ª Ed, São Paulo: Atheneu, 746 p. 2014.

TELLES, D. R.; KARKI, N.; MARSHALL, M. W.; Oral Fungal Infections: Diagnosis and Management. **Dental Clinics**, v. 61, p. 319–349, 2017.

UBUKATA K, NONOGUCHI R, MATSUHASHI M, KONNO M (1989). Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus*-specific penicillin-binding protein. **Journal of Bacteriology**. v. 171, n. 5, p. 2882–5, 1989.

VAN VUUREN, S.; HOLL, D. Antimicrobial natural product research: A review from a South African perspective for the years 2009–2016. **Journal of Ethnopharmacology** v. 218, p. 236-252, 2017.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants; safe cure? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEIRA, S. C. H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

VON POSER, G. L.; MENTZ, L. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMOES, C. M. O. et al.(org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., p. 75-89. 2003.

VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. **Molecules**, v. 14, p. 2535-2554, 2009.

WALDVOGEL, F. A. Infectious diseases in the 21st century: old challenges and new opportunities. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 8, p. 5-12, 2004.

WALLAND, J.; LAUPER, J.; FREY, J.; IMHOF, R.; STEPHAN, R.; SEUBERLICH, T.; OEVERMANN, A. *Listeria monocytogenes* infection in ruminants: Is there a link to the environment, food and human health? A review. **Übersichtsarbeiten**, v. 157, n. 6, 2015, 319–328, 2015.

WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**. ASM Press: Washington, 2004.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**. v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview: biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology Baltimore**, v. 182, n. 10, p. 2675-7679, 2000.

WHO. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 3, p. 383–394, 2014.

WINN, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P., et al. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1565, 2008.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; JUNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus*

aureus e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 4, 2009.

ZENG, D.; DEBABOV, D.; HARTSELL, T. L.; CANO, R. J.; ADAMS, S.; SCHUYLER, J. A.; MCMILLAN, R.; PACE, J. L. Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance, **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 12, p. a026989, 2016.

ZHENG, Y.; HUANG, W.; YOO, J. G.; EBERSOLE, J. L.; HUANG, C. B. Antibacterial compounds from *Siraitia grosvenorii* leaves. **Natural product research**, v. 25, n. 9, p. 890-897, 2011.