



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Jorge Belém Oliveira Júnior

**Atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotoxicidade das riparinas I, II e III  
frente isolados clínicos multidroga-resistentes de espécies de importância  
médica**

RECIFE

2018

JORGE BELÉM OLIVEIRA JÚNIOR

**Atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotoxicidade das riparinas I, II e III frente isolados clínicos multidroga-resistentes de espécies de importância médica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dyana Leal Veras.

Recife

2018

Catálogo na fonte:  
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4: 1895

O48a Oliveira Júnior, Jorge Belém.  
Atividade antimicrobiana antibiofilme e citotoxicidade das riparinas I, II e III, frente isolados clínicos multidrogas resistentes de espécies de importância médica / Jorge Belém Oliveira Júnior. – Recife: o autor, 2018.  
120 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em medicina tropical.

Inclui referências, apêndices e ilustrações.

1. Planta. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. *Acinetobacter baumannii*. 4. Biofilme. I. Santos, Fábio André Brayner dos (orientador). II. Título.

616.9 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 055)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

---

**JORGE BELÉM OLIVEIRA JÚNIOR**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E CITOTOXICIDADE DAS  
RIPARINAS I, II E III FRENTE ISOLADOS CLÍNICOS MULTIDROGA-  
RESISTENTES DE ESPÉCIES DE IMPORTÂNCIA MÉDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em: 22/02/2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Catarina de Souza Lopes (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gláucia Manoella de Souza Lima (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nilma Cintra Leal (Examinadora Externa)  
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ/PE



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Amélia Vieira Maciel

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**CORPO DOCENTE**

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães da Silveira

Vludíia Maria de Assis Costa

**CORPO DOCENTE COLABORADOR**

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Virginia Maria Barros de Lorena

*Dedico,*

*Meus sinceros e mais extensos  
agradecimentos ao meu pai-avô José Júlio  
Brechó, in memoriam, que sempre se  
empenhou para o meu desempenho  
profissional e pessoal.*

*À minha mãe Fátima por todo apoio  
incondicional dedicado a mim, além da luta  
diária para que eu me mantivesse estudando.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a DEUS por todo suporte espiritual, e principalmente por ser o meu Porto Seguro nos momentos de tormentos, tribulações e decepções, além de me proporcionar realizações profissionais e pessoais.

À minha irmã Thati, por todo apoio psicológico, amoroso e pela generosidade em saber me ouvir sem me deixar tropeçar nas dificuldades da vida. E ao meu cunhado Claudio (Kiko) por me auxiliar e socorrer sempre que houve necessidade. E à minha irmã Nathalya.

À família Lima Araújo por todo apoio, principalmente ao Humberto, pelos auxílios, incentivos e calma em saber me ouvir, e por todo amor.

À minha tia, Prof<sup>a</sup>. Me. Jonorete de Carvalho por estar presente em todos os momentos, me indicando o melhor caminho acadêmico a seguir e por ser um espelho de dedicação e responsabilidade. À minha avó Angelita, pelos questionamentos e pelas “saudades”.

À minha amiga, Me. Elizabeth Beltrão, pelos auxílios acadêmicos e sugestões diárias no Recife/PE. E por me indicar o melhor caminho; por fim, minha eterna parceira profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Brayner e ao Prof. Dr. Luis Alves pela receptividade no laboratório (em 2016), ensinamentos diários, dicas de estudos e de vida, e por todo amor, além da confiança em mim e no meu trabalho. E à coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dyana Veras pelas sugestões e motivação.

Aos meus amigos: Fábio Belarmino, Marina Barros, Liliane Lima, Iury Rodrigues, Natiele Vitorino e Luiz Araújo, pelo incentivo durante a seleção da pós-graduação, ajudando nas minhas expectativas e frustrações, além da mudança para o Recife/PE.

Ao meu amigo/irmão Ricardo Amorim (Riquinho), *in memoriam*, por sempre torce por mim e para que eu obtivesse o melhor todos os dias.

Aos amigos, Me. José Vieira Neto e Me. Ingrid Tibúrcio, por me proporcionarem uma base desde o ano de 2014, durante o primeiro processo seletivo da pós-graduação e as sugestões e esclarecimentos para o melhor aproveitamento do curso.

À família Menezes, por não me deixar desistir em nenhum momento, me mantendo no foco e me incentivando a lutar por meus ideais acadêmicos.

Ao melhor trio: Prof<sup>a</sup>. Me. Karla Ribeiro, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Oliveira e Dr<sup>a</sup>. Taciana Higino, pelas inúmeras ajudas e esclarecimentos em todas as etapas.

Ao grande companheiro profissional, que se tornou meu amigo, Everton Moraes, pela receptividade no laboratório, por me incentivar e me proporcionar bastante aprendizado.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Celular e Molecular - Dpto de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE), em especial, #TEAMBACTERIA: Me. Catarina Freitas, Me. Fernanda Lima e Everton Moraes; além de: Dr<sup>a</sup>. Amanda Aliança, Me. Camila Queiroz, Me. Amanda Falsinha, Nil Soares (Margi1) e Léo Belo (Margi2). E aos demais colegas do laboratório.

Ao Prof. Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí por confiar em nosso trabalho e ceder, gentilmente, os compostos utilizados neste projeto.

À turma de Pós-graduação em Medicina Tropical (2018.1), por todos os momentos durante as aulas, com muitas risadas e poucas lágrimas, principalmente Kamila Kássia, Marcela Vieira e Lucas Portela.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, em especial, Prof. Dr. Bruno Severo, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Catarina Lopes, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Amélia

Maciel e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sylvia Hinrichsen, por toda confiança durante a pós-graduação e pelas inúmeras discussões e incentivos em sala de aula.

Aos membros da banca de qualificação e defesa: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Catarina Lopes, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Manoella de Souza e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nilma Cintra Leal, pelos questionamentos, esclarecimentos e dicas para a melhoria e desenvolvimento desse projeto.

Ao Sr. Walter e à equipe administrativa da Pós-graduação em Medicina Tropical, pelas dicas e por me dá um suporte acadêmico.

À equipe do Setor de Esterilização do Instituto Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ/PE, Edson, Rita e Nelson, por ter ajudado, direta ou indiretamente no desenvolvimento desse projeto.

À equipe do Laboratório de Microbiologia Clínica e Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), por me incentivarem e colaborarem com a melhoria profissional, em especial, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Maranhão.

Ao grupo do Facebook “Bolsistas CAPES”, pelos esclarecimentos e incentivos em cada etapa da pós-graduação.

À ferramenta *on line* Sci-hub, pelos artigos científicos disponibilizados.

À equipe do Setor de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE).

Aos funcionários do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ/PE.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste projeto.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a DEUS, não sou o que era antes.”*

*Marthin Luther King*

## RESUMO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) permanecem como um problema de saúde pública em consequência da identificação de isolados clínicos bacterianos multidroga-resistentes (MDR), característica capaz de diminuir as opções terapêuticas das IRAS. Este estudo teve o objetivo de investigar a atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica de riparinas (I, II e III), bem como as alterações ultraestruturais induzidas *in vitro* em espécies bacterianas de importância médica. A citotoxicidade das riparinas foi analisada pela técnica do sal de tetrazólio (MTT) em células Vero e sua ação hemolítica verificada em eritrócitos humanos. Através da microdiluição em caldo foi determinada a concentração inibitória mínima das riparinas frente cepas padrão ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Cinco isolados bacterianos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii* foram analisados quanto à atividade antimicrobiana dos compostos e alterações ultraestruturais induzidas *in vitro* através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), além de submetidos à formação de biofilme na presença e ausência do composto avaliado. Observou-se que a riparina III exibiu uma concentração citotóxica similar (142,0 µg/mL) às demais riparinas e antimicrobianos avaliados (oxacilina e meropenem), e ação hemolítica de 25,99%. Além disso, apresentou atividade antimicrobiana frente cepas padrão ATCC e isolados MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*, sendo inativa em cepas padrão ATCC de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. A riparina III ainda reduziu significativamente a formação do biofilme dos isolados clínicos MDR de *S. aureus*. Por MEV foi constatada a ação da riparina III em *S. aureus* e *A. baumannii*, onde as células apresentaram alterações na morfologia e danos na superfície celular, incluindo rugosidade acentuada além de protuberâncias e extravasamento citoplasmático. Com a realização deste estudo conclui-se que a riparina III apresenta atividade antimicrobiana frente isolados MDR de *S. aureus* e *A. baumannii* causando diferentes alterações ultraestruturais *in vitro*, além de exibir potencial de inibição da formação de biofilme, promovendo subsídios para estudos subsequentes para desenvolver novas opções terapêuticas envolvendo a riparina III.

**Palavras-chave:** Planta. *Staphylococcus aureus*. *Acinetobacter baumannii*. biofilme.

## ABSTRACT

This study aimed to investigate the antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic activity of riparins (I, II and III), as well as the ultrastructural changes induced in bacterial species of medical importance. Cytotoxicity of riparins was analyzed by MTT assay in Vero cells and their hemolytic action verified in human erythrocytes. By microdilution in broth could be determined the minimum inhibitory concentration of riparins against ATCC strains of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Multidrug-resistant bacterial isolates of susceptible species were analyzed for susceptibility of compounds and ultrastructural changes induced *in vitro* by scanning electron microscopy (SEM), in addition to biofilm formation in the presence and absence of the evaluated compound. It was observed that riparin III showed antimicrobial activity against ATCC strains and multidrug-resistant isolates of *S. aureus* and *A. baumannii*, exhibiting low cytotoxicity and hemolytic action. In SEM, the action of riparin III on *S. aureus* and *A. baumannii* was observed, where the cells showed changes in morphology and cell surface damage, including roughness, besides to protuberances and cytoplasmic extravasation. Riparin III significantly reduced the biofilm formation of *S. aureus* multidrug-resistant isolates. Thus, concludes of this study that the riparin III presents antimicrobial activity against multidrug-resistant isolates of *S. aureus* and *A. baumannii* causing different ultrastructural changes besides potential of inhibition of the formation of biofilms, promoting subsidies for subsequent analyzes in the development of new options therapeutic effects involving riparin III.

**Keywords:** Plant. *Staphylococcus aureus*. *Acinetobacter baumannii*. biofilm.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** *Staphylococcus aureus* cultivado em ágar manitol salgado. A formação de halo amarelo ao redor das colônias pela fermentação do manitol é uma indicação presuntiva da espécie ..... 24

**Figura 2.** *Klebsiella pneumoniae* cultivado em ágar Mac Conkey. Esta espécie é fermentadora de lactose, produzindo essa coloração característica e colônias mucoides ..... 27

**Figura 3.** *Acinetobacter baumannii* cultivado em ágar Mac Conkey. Esta espécie não é fermentadora de lactose, apresentando uma coloração ligeiramente rosada ou sem cor ..... 30

**Figura 4.** *Pseudomonas aeruginosa* cultivado em ágar CLED. A liberação de piocianina e pioverdina produz uma pigmentação esverdeada fluorescente e odor característico, indicando a identificação presuntiva da espécie ..... 33

**Figura 5.** Ciclo do biofilme: (1) adesão de células planctônicas à superfície; (2) secreção de adesinas, matriz polimérica extracelular e proliferação celular; (3) formação de microcolônias e maturação do biofilme; (4) desprendimento das células, retornando à fase planctônica ..... 36

**Figura 6.** Fórmulas estruturais de substâncias/metabólitos secundários com atividade antimicrobiana obtidos de diversas espécies vegetais ..... 39

**Figura 7.** Frutos verdes da espécie vegetal *Aniba riparia* (Nees) Mez ..... 41

### Artigo:

**Figura 3.** Valores das densidades óticas (DO) de biofilmes de isolados MDR de *S. aureus* e *A. baumannii* expostos à riparina III. Para a análise de significância, foi utilizado ANOVA e pós-teste T de *Student*. Os valores \*\* diferem significativamente entre as condições experimentais ( $p < 0,05$ ) ..... 71

**Figura 4.** Eletromicrografia das alterações ultraestruturais induzidas pela ação da riparina III em isolados clínicos multidroga-resistentes de *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* por microscopia eletrônica de varredura ..... 72

**Figura 5.** Caracterização e perfil de resistência a antimicrobianos de isolados clínicos multidroga-resistentes obtidos de dois hospitais públicos do Recife/PE .... 73

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

**Tabela 1.** Infecções e dispositivos correlacionados às espécies bacterianas de importância médica envolvidas em infecções relacionadas à assistência à saúde ..... 22

**Quadro 1.** Extratos e derivados de espécies vegetais descritos entre os anos de 2005 a 2015 em isolados clínicos patogênicos multidroga-resistentes ..... 38

**Quadro 2.** Descrição das características químicas e moleculares das riparinas I, II e III ..... 42

### Artigo:

**Tabela 1.** Investigação da concentração citotóxica em células de linhagem Vero e percentual hemolítico em eritrócitos humanos de riparinas (I, II e III) e antimicrobianos disponíveis ..... 69

**Tabela 2.** Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima da riparina III frente cepas padrão ATCC e isolados clínicos multidroga-resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* obtidos em hospitais públicos do Recife/PE ..... 70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CBM	Concentração bactericida mínima
CC <sub>50</sub>	Concentração inibitória a cinquenta por cento da proliferação celular
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CECIH	Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Ótica
ESBL	<i>Extended Spectrum β-lactamases</i>
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp.</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
h	Horas
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
IS	Índice de Seletividade
ITU	Infecção do trato urinário
ITR	Infecção do trato respiratório
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LBCM	Laboratório de Biologia Celular e Molecular

LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
M	Molar
MDR	Multidroga-resistente
MDS	Multidroga-sensível
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milimetro
MRSA	<i>Methicillin-resistant S. aureus</i>
MSSA	<i>Methicillin-sensitive S. aureus</i>
MTT	Microcultura de tetrazólio
NAC/	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAV	Pneumonia associada à ventilação
PDR	Pan-droga-resistente
pH	Potencial de Hidrogênio
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
rpm	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCOPE	<i>Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPI	Universidade Federal do Piauí
USP	Universidade de São Paulo
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
XDR	Extensivamente droga-resistente

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1 Infecção relacionada à Assistência à Saúde .....	20
2.1.1 Espécies bacterianas de importância médica .....	23
2.1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
2.1.1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	26
2.1.1.3 <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	29
2.1.1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32
2.2 Biofilme.....	35
2.3 Atividades biológicas de produtos naturais .....	37
2.3.1 <i>Aniba riparina</i> (Nees) Mez e riparinas .....	41
2.4 Alterações ultraestruturais induzidas em agentes bacterianos.....	44
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>46</b>
3.1 Geral.....	46
3.2 Específicos .....	46
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
4.1 Obtenção das riparinas I, II e III .....	47
4.2 Cepas padrão ATCC e isolados clínicos bacterianos.....	47
4.3 Citotoxicidade das riparinas I, II e III .....	48
4.4 Ação hemolítica das riparinas I, II e III .....	48
4.5 Atividade antimicrobiana das riparinas I, II e III .....	49
4.6 Formação de biofilme dos isolados multidroga-resistentes .....	50
4.7 Atividade antibiofilme da riparina com ação antimicrobiana .....	51
4.8 Análise das alterações ultraestruturais induzidas <i>in vitro</i> por microscopia eletrônica de varredura .....	51
4.9 Análise estatística .....	52
4.10 Fluxograma .....	53
<b>5.RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
<b>Artigo:</b> Atividade antimicrobiana e antibiofilme das riparinas (I, II e III) e alterações ultraestruturais em isolados bacterianos multidroga-resistentes de espécies de importância médica.. .....	54
<b>6.CONCLUSÕES</b> .....	<b>75</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>96</b>
Antimicrobial activity and antibiofilm of riparins (I, II and III) and ultrastructural changes in multidrug-resistant bacterial isolates of species of medical importance.....	96
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>117</b>
Caracterização e perfil de resistência a antimicrobianos de isolados clínicos multidroga-resistentes obtidos em dois hospitais públicos do Recife/PE. ....	117

## 1 INTRODUÇÃO

Anualmente são descritas no mundo cerca de 10 milhões de Infecção Relacionada à Assistência a Saúde (IRAS), permanecendo uma preocupação mundial (SOUSA et al., 2016; KAYE; GALES; DUBOURG, 2017). No Brasil, entre 16 a 37 pacientes adquirem IRAS a cada 1.000 atendimentos, com notificação de 100 mil óbitos em decorrência das IRAS, em consequência do uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro e da pressão seletiva bacteriana (SHARLAND; SAROEY; BEREZIN, 2015; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

O grupo ESKAPE é composto por espécies bacterianas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, as quais estão envolvidas em IRAS recorrentes, devido aos diversos mecanismos de resistência a antimicrobianos (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; RENNER et al., 2017), bem como a capacidade de formação de biofilme (ERIKSSON et al., 2017; HØIBY et al., 2017). Este mecanismo de virulência também auxilia a sobrevivência dos microrganismos diante de algumas situações adversas, como a presença de antimicrobianos (OTTO, 2013).

As IRAS são responsáveis pela incapacitação ou morte de pacientes, gerando grandes implicações financeiras e econômicas (PAZ; FORTES; SILVA, 2015; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Devido à alta incidência de isolados multidroga-resistência (MDR) e formadores de biofilme envolvidos em IRAS, caracteriza-se uma redução abrupta na eficácia dos antimicrobianos usuais no tratamento dessas infecções (CRESS et al., 2014), sendo necessária a análise de novas substâncias mais potentes e menos tóxicas com caráter antimicrobiano.

Os compostos naturais são mundialmente utilizados para o tratamento e cura de infecções, sendo as plantas, a principal fonte de fármacos na medicina alternativa (FLOR; BARBOSA, 2015). Estima-se a existência de mais de 500.000 espécies de plantas identificadas, onde grande parte dessa biodiversidade encontra-se no Brasil, o qual apresenta um número superior a 20% do número total de espécies vegetais (FORZZA, et al 2010; CARVALHO, 2015). Este fator pode auxiliar no desenvolvimento de pesquisas sobre as atividades biológicas de compostos naturais.

Diversas atividades biológicas de compostos naturais têm sido descritas, como: antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, inseticida, antimoluscida, antiproliferativo, entre outras (BEZERRA et al., 2013). Dentre estes compostos, as riparinas naturais I, II e III são obtidas do fruto verde da *Aniba riparia*, as quais exibem atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas e fúngicas (BARBOSA et al., 1988; CATÃO et al., 2005; CATÃO et al., 2010). No entanto, é importante analisar quanto sua atividade antimicrobiana e antibiofilme das riparinas naturais I, II e III, além das possíveis alterações ultraestruturais em isolados clínicos MDR e formadores de biofilmes envolvidos em IRAS. O desenvolvimento de novas substâncias com atividade antimicrobiana e antibiofilme se torna extremamente necessário em consequência da identificação de isolados bacterianos MDR e formadores de biofilme, característica capaz de diminuir amplamente as opções de tratamento das IRAS. Por tais aspectos, a análise de novas opções terapêuticas visa aumentar a atividade biológica dos compostos e minimizar os efeitos tóxicos (CRESS et al., 2014; BUSH et al, 2014).

Assim, devido à diminuição da eficácia dos antimicrobianos disponíveis para fins terapêuticos face a grande resistência bacteriana, este estudo objetiva analisar a atividade antimicrobiana e antibiofilme das riparinas I, II e III em isolados clínicos bacterianos MDR e formadores de biofilme envolvidos em IRAS, fornecendo subsídios para os estudos que visem o desenvolvimento de novas opções terapêuticas de IRAS.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Infecção Relacionada à Assistência à Saúde

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são definidas como toda e qualquer infecção adquirida em instituições hospitalares ou unidade prestadora de serviço assistencial à saúde, com manifestações relacionadas aos procedimentos assistenciais e hospitalares, terapêutico ou diagnóstico (PEREIRA et al., 2016a; RODRIGUES et al., 2016). Em virtude do impacto negativo nos pacientes, profissionais e instituições de saúde, as IRAS ainda representam uma preocupação mundial (PAZ; FORTES; SILVA, 2015; SOUSA et al., 2016; KAYE; GALES; DUBOURG, 2017), produzindo altos custos aos pacientes e ao Governo (SHARLAND; SAROEY; BEREZIN, 2015; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

Durante décadas, a prevalência de espécies bacterianas envolvidas em IRAS sofreu transformações, embora vírus e fungos sejam grandes potenciais. Entre os anos de 1940-1950, bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, predominavam nos índices de infecções. Em meados da década de 1970, os bastonetes Gram-negativos, com destaque para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, se apresentavam como grandes responsáveis (ANVISA, 2013a; PAZ; FORTES; SILVA, 2015; RAMIREZ-BLANCO et al., 2017).

A partir do ano de 1990, isolados clínicos de *S. aureus* apresentaram o fenótipo de resistência à metilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA), se tornando um problema pandêmico que perdura até hoje, devido à limitação das opções terapêuticas disponíveis (ANVISA, 2013a; FERREIRA et al., 2015; BLEIZIFFER et al., 2017). Inclusive, infecções por MRSA nos Estados Unidos da América (EUA) superam o índice de mortalidade dos casos de doença de Parkinson, enfisema, homicídios e hepatite B, além dos agravos em decorrência da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (GROSS, 2013; GOLKAR; BAGASRA; PACE, 2014).

Nos anos 2000, as bactérias Gram-negativas atingem visibilidade no setor hospitalar (ANVISA, 2013a), com notoriedade para *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*, as quais apresentam inúmeros mecanismos de resistência aos antimicrobianos, sendo descritos como os principais agentes de

IRAS em pacientes hospitalizados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (SHARLAND; SAROEY; BEREZIN, 2015; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2016; REIS et al., 2016).

Após o ano de 2008, alguns estudos a respeito da vigilância hospitalar e dados da Sociedade de Doenças Infecciosas da América (*Infectious Diseases Society of America*) foram compilados, mencionando um grupo de agentes bacterianos, conhecido como "ESKAPE", que engloba as seguintes espécies: *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp. Este grupo é caracterizado por espécies recorrentes associadas às IRAS, principalmente em pacientes imunocomprometidos, sendo amplamente relatadas, devido aos inúmeros mecanismos potenciais de resistência aos antimicrobianos (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; RENNER et al., 2017).

A maior problemática envolvendo pacientes com IRAS continua sendo na UTI, uma vez que o paciente está bastante exposto aos riscos de adquirir infecção (FIGURA 1), haja vista sua condição clínica e procedimentos invasivos. Tais aspectos asseguram que esses pacientes possuem entre 5 a 10 vezes maior probabilidade em adquirir IRAS, representando cerca de 20% do total das infecções em um hospital (SHARLAND; SAROEY; BEREZIN, 2015; RODRIGUES; PEREIRA, 2016; SOUSA et al., 2016).

Apesar dos avanços nas medidas de biossegurança, a taxa de IRAS aumentou em 36% nos últimos 20 anos. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention* - CDC) assegura que entre 5 a 15% dos pacientes hospitalizados contraem IRAS. Anualmente, estima-se que são descritas no mundo cerca de 10 milhões de IRAS, resultando em 300 mil óbitos, com custo aproximado de 17 a 29 bilhões de dólares (ALMEIDA et al., 2015).

**Tabela 1.** Infecções e dispositivos correlacionados às espécies bacterianas de importância médica envolvidas em infecções relacionadas à assistência à saúde.

<b>Infecções e dispositivos</b>	<b>Espécies bacterianas envolvidas</b>
Infecções em ferida	<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Infecções em pele e partes moles	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Infecções em sítio cirúrgico	<i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Infecções da corrente sanguínea	Bacilos Gram-negativos
Fibrose cística	<i>P. aeruginosa</i>
PAV*	<i>A. baumannii</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Bacteremia	<i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i>
Cateter endovascular	<i>S. aureus</i>
ITU**	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>

\*PAV, Pneumonia associada à ventilação mecânica; \*\*ITU, infecção do trato urinário.

**Fonte:** Vieira; Picoli, 2015; Canzi; Colacite, 2016; Nebes et al., 2016; Oliveira et al., 2016; Oliveira Junior et al., 2016; Rodrigues et al., 2016; Santos et al., 2016a; Silva, 2016; Souza et al., 2016a; Souza et al., 2016b; Djordjevic; Folic; Jankovic, 2017.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve que entre 16 a 37 pacientes adquirem IRAS a cada 1000 atendimentos no Brasil, equivalente a 3%, com taxa de letalidade atingindo 14.35% (ANVISA, 2013a; SHARLAND; SAROEY; BEREZIN, 2015). Estes dados podem ser produzidos principalmente pelas prescrições de antimicrobianos, nas quais 50% são consideradas inapropriadas, aumentando a identificação de microrganismos multidroga-resistentes (MDR) envolvidos em IRAS (ROCHA-PEREIRA; LAFFERTY; NATHWANI, 2015; WHO, 2015). No entanto, como não há um banco de dados epidemiológicos sobre IRAS no País, estes dados podem não ser correlatos (SOUSA et al., 2016).

Entre os anos de 2014 e 2016, Pernambuco apresentou alta prevalência de *Staphylococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Candida* spp. e *E. coli* envolvidos em IRAS (CECIH, 2016; PEREIRA et al., 2016b), demonstrando necessidade da adesão das instituições de assistência à saúde aos programas para prevenção e controle de IRAS. Estes dados indicam que através desse processo de adesão, pode haver redução das IRAS em até 70%, como as infecções da corrente sanguínea (CDC, 2016).

Uma recente publicação da OMS divulga os "patógenos prioritários" multidroga-resistentes, caracterizados como uma grande ameaça à saúde humana, devido, principalmente, à transferência de material genético entre as bactérias. Podem ser citadas: *A. baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, e Enterobacteriaceae (incluindo *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Serratia* spp. e *Proteus* spp.) resistente aos carbapenêmicos e produtores de ESBL (SUBRAMANI; NARAYANASAMY; FEUSSNER, 2017; WHO, 2017).

A análise de novas alternativas terapêuticas das IRAS deve-se principalmente à necessidade de buscar compostos naturais com menor potencial de toxicidade e mais eficiência frente isolados clínicos MDR e formadores de biofilme. Tais compostos constituem ampla atividade biológica no tratamento de infecções, o que representa uma grande contribuição para a descoberta de novos agentes antimicrobianos (ELLER et al., 2015). Os mecanismos de resistência e virulência dos microrganismos contribuem significativamente para o crescente problema de saúde pública mundial, sendo um obstáculo à terapêutica, visto à constante redução dos antimicrobianos disponíveis (SILVA et al., 2010; ANVISA, 2013a; BLEIZIFFER et al., 2017)

## 2.1.1 Espécies bacterianas de importância médica

### 2.1.1.1 *Staphylococcus aureus*

Pertencem à família Micrococcaceae, sendo caracterizados como cocos imóveis com aproximadamente 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Podem apresentar diversos arranjos, são anaeróbios facultativos, não esporulados e geralmente não encapsulados, produtores de catalase, em sua maioria fermentadores de manitol (FIGURA 1), podendo suportar temperaturas de até 60°C, além de produzir hemolisina (ANVISA, 2013a; LIMA et al., 2015).

*S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva que pertence à microbiota humana, colonizando as fossas nasais, garganta, intestinos e pele de indivíduos saudáveis. Por tal motivo, sua transmissão e disseminação podem ocorrer principalmente por contato direto (mãos contaminadas dos profissionais ou pacientes) e indireto

(através de superfícies contaminadas) (ANVISA, 2013a; LIMA et al., 2015; EVANGELISTA; OLIVEIRA, et al., 2015).

**Figura 1.** *Staphylococcus aureus* cultivado em ágar manitol salgado. A formação de halo amarelo ao redor das colônias pela fermentação do manitol é uma indicação presuntiva da espécie.



**Fonte:** American Society for Microbiology (2014).  
<http://www.microbelibrary.org/>  
(Imagem acessada em 15/07/2017).

São capazes de sobreviver em condições ambientais adversas ou com mudanças bruscas por bastante tempo, sendo responsáveis por altas taxas de IRAS em pacientes hospitalizados, com alta incidência em infecção na corrente sanguínea, meningite, pericardite, bacteremia e síndrome do choque tóxico (LIMA et al., 2015; ROMÃO et al., 2016).

Inúmeros estudos descrevem a alta incidência de *S. aureus* em pacientes internados, sendo descritos como MDR e formadores de biofilme. Em 2015, Goulart et al. publicaram um estudo descritivo e transversal de *swab* nasal de pacientes no Hospital de Força Aérea do Galeão/RJ. Das 348 amostras coletadas, 14.3% se mostraram positivas para *S. aureus*, sendo 42% desses isolados resistentes à oxacilina. Oliveira et al. (2016) descrevem um estudo retrospectivo na Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Universidade de São Paulo (USP) em 11.030 pacientes. Foram identificados 529

isolados bacterianos, com alta prevalência de *S. aureus*, onde 72% desses isolados apresentaram o perfil de MRSA. Resultados similares foram descritos por Sala et al. (2016) através de revisão de literatura entre 2012 e 2016 sobre isolados bacterianos envolvidos em infecções em pacientes queimados. Os autores indicaram a alta frequência de *S. aureus*, seguido por *S. aureus* coagulase negativa.

Panday et al. (2016) analisaram 598 amostras de urina de pacientes da UTI para estimar a presença de isolados MDR. Entre os isolados Gram-positivos foi reportada a prevalência de *S. aureus* (3,6%). No mesmo ano, Chou et al. (2016) identificaram em 20 pacientes com embolia pulmonar séptica entre 2005 e 2013, a presença de isolados Gram-positivos, onde *S. aureus* esteve em 35%.

Por meio de investigação em 43 pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica em Maringá/PR entre setembro de 2013 e agosto de 2014, Ferreira et al. (2017) identificaram *S. aureus* (23.1%) nas culturas de secreção traqueal. Ainda em 2017, Sharma et al. verificaram através de um estudo retrospectivo sobre o perfil bacteriano em infecções pós-queimadura de 50 pacientes, a alta frequência de *S. aureus* (35%) entre os microrganismos Gram-positivos.

Normalmente, os isolados de *S. aureus* apresentam altos índices de mortalidade em consequência de sua alta virulência e prevalência, gerando um grave problema de resistência aos antimicrobianos, além de complicações decorrentes do uso inadequado de antimicrobianos (LIMA et al., 2015; CAMILO; PEDER; SILVA, 2016; LOUREIRO et al., 2016; SOUSA et al., 2016).

Inúmeros relatos de isolados MRSA têm sido descritos como fator endêmico em instituições da saúde e comunidades pelo mundo, adquirindo maior repercussão, devido sua gravidade (GOULART, et. al., 2015; LOUREIRO et al., 2016). No Brasil, entretanto, não há dados sistematizados que apontem sua ocorrência e fatores relacionados às IRAS, e em algumas situações, esses dados não são fornecidos pelas instituições de saúde (EVANGELISTA; OLIVEIRA, et al., 2015; LIMA et al., 2015).

No estudo de Heggendorfn et al. (2016), a maioria (83,34%) das espécies de *Staphylococcus* spp. foram resistentes à oxacilina e ciprofloxacina, amoxicilina/clavulanato (88,89%) e cefepime (72,23%). Sharma et al. (2017) identificaram 35% de *S. aureus* em 50 pacientes admitidos na Unidade de

Queimadura do Hospital Mahatma Gandhi, sendo resistentes à piperacilina-tazobactam (40%), ceftriaxona (95%) e oxacilina (40%).

Os isolados clínicos de MRSA são formadores de biofilme em infecções de feridas crônicas, osteomielite e endocardite. Em razão dos altos padrões de resistência a múltiplos fármacos, esta espécie está constantemente envolvida em IRAS (GOULART, et. al., 2015). Dhiman et al. (2017) identificaram e caracterizaram o gene *sasX* em isolados de MRSA do Nordeste da Índia e associaram seu papel na formação de biofilme. Dos 150 isolados, 8 abrigavam o gene *sasX*, além de que todos estes isolados eram altamente resistentes à oxacilina e penicilina. Os autores indicam que a formação de biofilme foi observada com mais frequência em isolados *sasX* + MRSA em comparação aos isolados *sasX* - MRSA, pois este gene promove a adesão celular e ajuda nos mecanismos de evasão imunológica.

Eriksson et al. (2017) determinaram o efeito antibacteriano e antibiofilme do hipoclorito de sódio em isolados de *S. aureus* obtidos da dermatite atópica. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio dose-dependente inibiu o crescimento bacteriano e uma significativa formação de biofilme.

#### 2.1.1.2 *Klebsiella pneumoniae*

Participam do gênero *Klebsiella*, bactérias Gram-negativas, imóveis, anaeróbicas facultativas, oxidase negativa e lactose positiva (FIGURA 2), que variam de 0,3 a 1,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 0,6 a 6,0  $\mu\text{m}$  de comprimento. Pertencem à família Enterobacteriaceae, sendo encontradas livremente em plantas, ambientes aquáticos e solo, ou colonizando mucosas como componente da microbiota. Normalmente são responsáveis por infecções pulmonares, intra-abdominais, bacteremia e ITU em pacientes imunocomprometidos (COELHO et al., 2015; PERNA et al., 2015; LOPES et al., 2016).

Podem ser comumente associadas às IRAS, sendo *K. oxytoca* e *K. pneumoniae* consideradas as espécies mais frequentes, tendo esta última três subespécies: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. O gênero *Klebsiella* foi descrito pela primeira vez no ano de 1885 por Trevisan, o qual homenageou o microbiologista

alemão Edwin Kleb. Já no ano de 1887, foi descrita a espécie *K. pneumoniae* (KRIEG; HOLT, 1984).

**Figura 2.** *Klebsiella pneumoniae* cultivado em ágar Mac Conkey. Esta espécie é fermentadora de lactose, produzindo coloração característica e colônias mucoides.



**Fonte:** American Society for Microbiology (2005).  
<https://www.sobomicroscopio.wordpress.com/2013/03/25/culturas-de-vigilancia-parte-ii/>  
(Imagem acessada em 15/07/2017).

Estudos recentes relatam *K. pneumoniae* como uma espécie emergente, devido ao aumento em sua incidência nas IRAS. Consultando os dados da CCIH do Hospital Universitário Alcides Carneiro, Paz et al. (2015) descrevem a identificação de *K. pneumoniae* em 23.3% episódios. No mesmo ano, Perna et al. (2015) executaram um estudo retrospectivo na UTI do Hospital e Maternidade Therezinha de Jesus em Juiz de Fora/MG. Foram analisados 193 prontuários, com observação da incidência de *K. pneumoniae* em 17% das ocorrências de IRAS nos pacientes em tratamento intensivo.

Ao descrever as características de infecções causadas por bacilos Gram-negativos resistentes a carbapenemases em pacientes pediátricos de Medellín/Colômbia, Vanegas, Parra e Jiménez (2016) expõem o aumento da presença desses microrganismos nesta população e a alta resistência de *K. pneumoniae* à ertapenem (94,1%), imipenem (92%) e meropenem (89,3%). Vale salientar a importância do monitoramento e implementação de programas de administração de antimicrobianos, evitando limitar as opções terapêuticas.

Joshi e Shah (2017) detectaram o padrão bacteriológico e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de hemoculturas de neonatos com septicemia em Gandhinagar/Índia. Dos 228 pacientes, 131 foram positivos para *K. pneumoniae* (58,01%) com resistência à ampicilina (69,1%), ácido amoxiclavulínico (63,1%), cefotaxima (55,2%) e gentamicina (47,3%). Estes dados se assemelham aos achados de Bency, Priyanka e Jose (2017) e Hearn et al. (2017), os quais identificaram *K. pneumoniae* resistente às cefalosporinas de 3ª geração em hemoculturas de pacientes pediátricos com pneumonia adquirida no hospital na Camboja.

Nos últimos anos, isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC vêm se tornando um problema de saúde pública, devido à fácil transmissibilidade de plasmídeos entre espécies bacterianas. Sendo assim, o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *K. pneumoniae* tem diminuído, promovendo o surgimento de isolados MDR (COELHO et al., 2015; NORCIA et al., 2015; ESTEBAN-CANTOS, et al., 2017).

O uso de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos também promove o surgimento de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos sob produção de enzimas KPC e metalo-enzimas, além da produção de ESBL e resistência a outros antimicrobianos, como as cefalosporinas (1ª, 2ª, 3ª e 4ª gerações), aztreonam, macrolídeos e aminoglicosídeos, com resistência a 95% dos antimicrobianos atuais (NORCIA et al., 2015; PERNA et al., 2015; SANTOS et al., 2016b). Além disso, *transposons* podem ser amplamente transferidos entre outras espécies bacterianas (LIMA et al., 2014; NORCIA et al., 2015).

Nas últimas décadas, o índice de mortalidade por *K. pneumoniae* produtora de KPC chegou a ser 30% a 40%, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dado considerado bastante superior quando comparado à *K. pneumoniae* não produtora de KPC (ANVISA, 2013b). A ANVISA menciona uma nota técnica descrevendo que a disseminação de *K. pneumoniae* produtora de KPC constitui um grave problema de saúde pública em diversas instituições de saúde no Brasil (ANVISA, 2013b; SEIBERT et al., 2014). Há diversos relatos de IRAS por KPC no mundo. Em um grande centro oncológico do Johns Hopkins Hospital em 2016, foi relatado quatro casos de pacientes infectados por KPC obtidos de *swab* retal (ROCK et al., 2017).

Os isolados de *K. pneumoniae* têm a capacidade de formar biofilme em superfície biótica e abiótica, estando diretamente associados às IRAS (OSTRIA-HERNANDEZ et al., 2017). Este mecanismo de virulência protege-os de desinfetantes, antimicrobianos e respostas imunes do hospedeiro (EI FERTAS-AISSANI et al., 2013). Além disso, essa a formação de biofilme tem sido observada em *K. pneumoniae* KPC positiva em ITU (KIRMUSAOĞLU et al., 2017). Vuotto et al. (2017a) verificaram fatores de virulência em *K. pneumoniae* e correlações entre o perfil de resistência a antimicrobianos e a capacidade de formar biofilme. Entre os 120 isolados identificados, 56 foram extensivamente droga-resistente (XDR) e 40 MDR. Os isolados XDR mostraram maior habilidade para formar biofilme (91,07%), sendo regulados por 7 de 8 genes, exceto *OmpK36*.

Em sua análise, Rajasekharan et al. (2017) investigaram os efeitos de *Arctium lappa* Linn. na formação de biofilme e expressão de genes associados à formação de biofilmes por *K. pneumoniae*. Segundo os autores, o CGA (ácido clorogênico) inibiu a formação de biofilme, mostrando que o CGA têm potencial antibiofilme contra infecções persistentes de *K. pneumoniae*.

#### 2.1.1.3 *Acinetobacter baumannii*

Os isolados de *A. baumannii* são cocobacilos Gram-negativos, imóveis, aeróbios estritos, catalase positivos, oxidase negativos e não fermentadores de glicose, pertencentes à família Moraxellaceae (FIGURA 3). Podem habitar o solo, água, alimentos, microbiota humana e animal (DETTORI et al., 2014; VIEIRA; PICOLI, 2015; LEE et al., 2016), adaptando-se facilmente a diferentes ambientes, devido à sua habilidade em obter fontes de carbono para o seu crescimento.

Atualmente são responsáveis por grande parte das complicações clínicas em pacientes imunocomprometidos por doenças de base ou por procedimentos cirúrgicos com internação prolongada em unidades de saúde e por surtos em UTI, bacteremia, ITU, meningite secundária, infecção de ferida cirúrgica e pneumonia associada à ventilação mecânica (VIEIRA; PICOLI, 2015; TAJEDDIN et al., 2016; ROBERTS et al., 2017).

**Figura 3.** *Acinetobacter baumannii* cultivado em Agar Mac Conkey. Esta espécie é oxidase negativa e não fermentadora de lactose.



**Fonte:** American Society for Microbiology (2005).  
<http://www.202.195.144.50/ASM/112-Introduce2.htm>  
(Imagem acessada em 15/07/2017).

Na última década, inúmeros relatos de surtos causados por *A. baumannii* têm sido publicados em diversos países, principalmente na Europa, América do Norte e América Latina. Avaliando os equipamentos, materiais e mobiliários de pacientes em isolamento por *A. baumannii* MDR e pacientes não-isolados da UTI do Hospital da Restauração no Recife/PE, Sales et al. (2014) evidenciam a presença de *A. baumannii* MDR em 12 amostras clínicas das 49 amostras coletadas. Estes dados são semelhantes aos descritos por Rocha et al. (2015), em Caruaru/PE, em um estudo transversal e descritivo na UTI, onde foram notados 94.4% dos equipamentos hospitalares contaminados, sendo 28,7% por *A. baumannii* com resistência a imipenem, levofloxacina e piperacilina/tazobactam em 75% dos casos.

Sousa et al. (2015) realizaram um estudo epidemiológico, transversal e retrospectivo buscando a prevalência de microrganismos na infecção da corrente sanguínea em idosos em Teresina/PI. Os autores citaram que *Acinetobacter* sp. apresentou prevalência de 21.2% nos 68 pacientes assistidos. Ainda no mesmo município, Carvalho et al. (2015) encontraram um índice superior (46.7%) comparado ao anterior, através de um levantamento epidemiológico e retrospectivo

em 58 prontuários de pacientes internados na UTI geral e neurológica de um hospital de urgência.

Zilberberg et al. (2016) observaram 229.028 pacientes com pneumonia ou sepses, demonstrando a presença de *A. baumannii* em hemocultura e secreção pulmonar em 1.423 pacientes (0.6%). Desses, 1.171 (82.3%) foram MDR e 239 (16.8%) foram XDR. Rodrigues et al. (2016) avaliaram os impactos e fatores determinantes do *bundle* para redução da pneumonia associada à ventilação mecânica. Foi concluído que houve aumento na incidência de PAV após implementação do *bundle* com alta frequência de patógenos Gram-negativos, como *A. baumannii* (50%).

Kanodia et al. (2017) conduziram um estudo retrospectivo na pediatria em 2014 na Dharan/Nepal. Foram coletadas 1.009 amostras de sangue de neonatos com suspeita ou confirmação de sepse, sendo 327 (32.4%) positivas para patógenos bacterianos. Entre os isolados Gram-negativos, *Acinetobacter* sp. (14.1%) foi o mais frequente, seguido por *Pseudomonas* sp. (5.5%). Uma análise semelhante da caracterização de infecções da corrente sanguínea e a mortalidade de pacientes queimados. De 177 pacientes, Tang et al. (2017) identificaram 323 patógenos, sendo *A. baumannii* o microrganismo mais comum (19.5%), seguido por *K. pneumoniae* (13.9%).

Ao investigar a prevalência de patógenos bacterianos em pacientes com pneumonia nosocomial e pneumonia associada à ventilação na UTI, Djordjevic et al. (2017) descrevem que 38.9% dos 620 pacientes assistidos apresentaram infecção por *A. baumannii*. Analisando a resistência aos carbapenêmicos em bacilos Gram-negativos e não fermentadores de lactose, Agarwal et al. (2017) isolaram *A. baumannii* (63; 63.63%) das 156 amostras clínicas de pacientes com infecções do trato respiratório. Além disso, os autores verificaram alta resistência ao imipenem (90.54%) e meropenem (95.2%) nesta espécie.

A incidência de *A. baumannii* é bastante alta, em torno de 88% das IRAS (BARTH JUNIOR, 2014; ZILBERBERG et al., 2016), isso devido à habilidade em sobreviver em superfícies abióticas, limitando significativamente as opções terapêuticas. Entretanto, no Brasil, há escassez de dados epidemiológicos a respeito do gênero *Acinetobacter* envolvido em IRAS (ROCHA et al., 2015; VIEIRA; PICOLI, 2015).

Diversos fatores de resistência aos antimicrobianos são observados em *A. baumannii*. No entanto, com o uso compulsório de antimicrobianos de amplo espectro, este fator pode ser ampliado (LEE et al., 2016), sendo notado um aumento significativo de linhagens com fenótipo MDR ou PDR (VIEIRA; PICOLI, 2015; LEE et al., 2016; ZILBERBERG et al., 2016).

Em sua pesquisa, Lee et al. (2016) isolaram uma cepa MDR (KBN10P02143) de *A. baumannii* da amostra purulenta de um procedimento cirúrgico. Através do VITEK-2, foi observada resistência aos carbapenêmicos, aminoglicosídeos e cefalosporinas, mas susceptível à polimixina B e colistina. Estes resultados se assemelham aos dados apresentados por Santos et al. (2016b), onde *A. baumannii* apresentou sensibilidade apenas à polimixina B e colistina, no Piauí/PI. Já no Recife, De Sá Cavalcanti et al. (2017) identificaram o isolado de *A. baumannii* produtor de bla<sub>OXA-253</sub> por sequenciamento, considerado XDR. E no estudo realizado por Tang et al. (2017) na China, os isolados da espécie de *A. baumannii* apresentaram 100% de resistência ao antimicrobiano imipenem.

Isolados de *A. baumannii* podem formar biofilme sob condições desfavoráveis, colonizando pacientes e equipamentos hospitalares, tornando-se frequente em surtos (DETTORI et al. 2014; VIEIRA; PICOLI, 2015). Estudando concentrações subinibitórias do trimetopim e sulfametoxazol na formação de biofilme de *A. baumannii* por inibição da expressão do *pili* *Csu*, foi observado que mesmo a ATCC 17978 sendo resistente aos antimicrobianos, em concentrações subinibitórias, eliminam a expressão de *pili*, um mecanismo de virulência, e reduzem a formação de biofilme (MOON; WEBER FELDMANA, 2017). Vuotto et al., (2017b) investigaram a capacidade de adesão e clonalidade de 128 isolados de *A. baumannii* obtidos de urina e cateteres urinários de pacientes entre 1991-2013. Sugere-se que as linhagens dominantes são menos aderentes e formadoras de biofilmes, juntamente com uma mudança do gene OXA-24/40 e OXA-58 para OXA-23, indicando que uma linhagem recente e generalizada, não depende da sua capacidade de aderir.

#### 2.1.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* pertence à família Pseudomonadaceae, composto por bacilos Gram-negativos com tamanho aproximado de 1,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  de

comprimento por 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de espessura. São oxidase e catalase positivos (FIGURA 4), aeróbios com motilidade através de um ou vários flagelos polares. Atualmente são descritas cerca de 140 espécies, entre as quais as mais recorrentes e envolvidas em IRAS são: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. stutzeri*, *P. maltophilia* e *P. putrefaciens* (FERREIRA et al., 2014; SILVA, 2016).

Podem ser consideradas espécies extremamente versáteis, pois habitam o solo, a água e os vegetais ou estão associadas às infecções oportunistas, mais frequentemente em infecção do trato urinário, feridas, pele, olhos, ossos e articulações, pneumonia e sepse, representando cerca de 80% das infecções crônicas (FERREIRA et al., 2014; HONG et al., 2015; CANZI; COLACITE, 2016; NEBES et al., 2016; SADER et al., 2017).

**Figura 4.** *Pseudomonas aeruginosa* cultivado em ágar CLED. A liberação de piocianina e pioverdina produz uma pigmentação esverdeada fluorescente e odor característico, indicando a identificação presuntiva da espécie.



**Fonte:** American Society for Microbiology (2006).  
<http://www.microbelibrary.org/>  
(Imagem acessada em 15/07/2017).

*P. aeruginosa* foi relatado como o primeiro patógeno Gram-negativo identificado na UTI (GLUPCZYNSKI et al., 2001). Por apresentar alta resistência aos antimicrobianos, detém maior importância clínica, ou por estar frequentemente envolvido nas infecções em pacientes gravemente enfermos e imunocomprometidos

com presença de processos invasivos, queimaduras e feridas pós-operatórias ou pela aderência a cateteres, ventiladores mecânicos e próteses (FERREIRA et al., 2014; CANZI; COLACITE, 2016; KHOSRAVI et al., 2016; DJORDJEVIC; FOLIC; JANKOVIC, 2017).

Através de estudo epidemiológico e retrospectivo nas notificações de IRAS pela CCIH na UTI do Complexo Hospitalar Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, Pereira et al. (2016a) corroboram os dados obtidos no ano de 2012, em que *P. aeruginosa* foi o isolado mais frequente (18.3%) nos 234 registros analisados.

No mesmo ano, ao relacionar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana, os fatores de virulência e a variabilidade genética, Silva (2016) apresentou dados de identificação de *P. aeruginosa* em Recife/PE, sendo 15 isolados considerados multidroga-sensíveis (MDS) e 15 MDR, concluindo que esta espécie pode acumular inúmeros fatores de virulência e múltipla resistência, dificultando o tratamento das IRAS. Na análise realizada por Canzi & Colacite (2016), incluindo todos os pacientes admitidos na UTI de um hospital do Paraná com uso de ventilação mecânica (>48h) resultou na identificação de *P. aeruginosa* (33.67%) em 2012 e 30.08% em 2013.

Isolados bacterianos de feridas de queimaduras obtidos entre 2010 e 2014 comparados aos dados de 1997 e 2002, indicou a presença de *P. aeruginosa* como o isolado mais comum (37%), seguido por *K. pneumoniae* (15%), *A. baumannii* (12%) e *S. aureus* (12%). Os autores concluíram que é bastante alarmante o aumento da resistência aos antimicrobianos por bactérias Gram-negativas, devido à redução das opções terapêuticas disponíveis. Esses dados podem ser confirmados por Ramirez-Blanco et al. (2017), os quais verificaram a prevalência de 24,1% de *P. aeruginosa* em todos os pacientes hospitalizados com feridas de queimaduras (n=402) no Hospital Universitário de Santander, na Colômbia.

Ainda em 2017, Ergul et al. relataram a prevalência de pneumonia associada à ventilação em uma UTI pediátrica e o perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados envolvidos. Os autores observaram *P. aeruginosa* como o microrganismo frequentemente identificado (32%), sendo estes susceptíveis à colistina (92,6%), piperacilina-tazobactam (71,4%), amicacina (65,2%) e gentamicina (52,2%).

Sabe-se que o genoma de *P. aeruginosa* confere resistência aos antimicrobianos ou adquire resistência durante a terapêutica, incluindo todos os  $\beta$ -

lactâmicos (exceto imipenem), fluoroquinolones e aminoglicosídeos, demonstrando altos níveis de resistência aos antimicrobianos conhecidos (FERREIRA et al., 2014; HONG et al., 2015; CANZI; COLACITE, 2016; SADER et al., 2017). Essa espécie ainda induz taxas de mortalidade ultrapassando 38% de ocorrência nas enfermarias e 50% na UTI, dificultando o seu controle e a introdução da terapêutica inicial (FERREIRA et al., 2014).

Sader et al. (2017) esclarecem que a alta taxa de mortalidade por *P. aeruginosa* está agregada à terapia antimicrobiana inicial inapropriada e/ou ao atraso da terapia antimicrobiana apropriada. Assim, avaliando 7.452 isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes com pneumonia, infecção da pele, ITU, infecção da corrente sanguínea e outras infecções, os autores observaram os fenótipos MDR e XDR (extensivamente droga-resistente) em 1.151(15.4%) e 698(9.4%) isolados clínicos, respectivamente.

Um estudo epidemiológico conduzido pelo SCOPE (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance* - Vigilância e Controle de Patógenos de Importância Epidemiológica) no Brasil revelou que isolados de *P. aeruginosa* são resistentes ao meropenem (35.8%), imipenem (36.8%) e ceftazidima (36.6%) (SILVA, 2016). Outros autores ainda acrescentam que há diminuição da sensibilidade aos antimicrobianos de amplo espectro (carbapenêmicos e cefalosporinas antipseudomonas) no Brasil e em outros países (HONG et al., 2015; CANZI; COLACITE, 2016; KHOSRAVI et al., 2016).

Os estudos dos mecanismos de virulência, como a formação de biofilme, são frequentemente relatados em agentes bacterianos. Comumente, *P. aeruginosa* tem sido modelo para estudos do biofilme, devido aos avanços significativos dos mecanismos envolvidos na formação do biofilme (RYBTKE et al., 2015). Esta espécie bacteriana é capaz de se aderir a tecidos biológicos ou materiais inorgânicos, tornando-se resistente a diversos fatores ambientais, envolvido em ITU com uso de cateter, pneumonia associada à ventilação, etc. (CHAN et a., 2016).

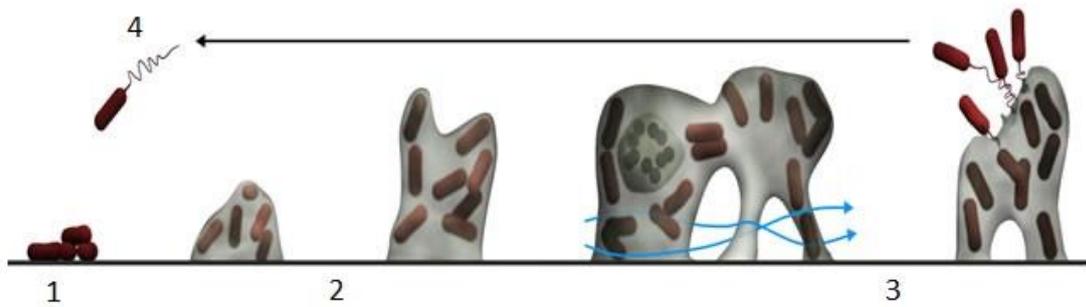
## 2.2 Biofilme

O biofilme consiste de uma estrutura porosa e complexa, formada por uma ou mais espécies bacterianas aderidas à superfície biótica ou abiótica (BJARNSHOLT,

2013). Normalmente é circundado por uma matriz polimérica extracelular, composta principalmente por polissacarídeos, DNA, proteínas e células mortas (BRANDA et al. 2005), além de canais de influxo e efluxo de nutrientes e de produtos de metabolismo (BJARNSHOLT, 2013). Essa é uma das estratégias utilizadas por diversas espécies bacterianas para promover sua sobrevivência frente a antimicrobianos e fagocitose (OTTO, 2013; ERIKSSON et al., 2017).

Inicialmente, o biofilme foi observado por Antonie van Leeuwenhoek no ano de 1675 através de análises de placa dentária (COSTERTON, 1999) (FIGURA 5). Estudos posteriores demonstraram a existência de biofilme, principalmente em infecções associadas a equipamentos e dispositivos ou envolvido em IRAS, como: otite média, pneumonia fibrose cística, infecção de ferida crônica, musculoesquelética, fasciíte necrosante, infecção no trato biliar, osteomielite, prostatite bacteriana, endocardite valvular, ITU, etc. (RYBTKE et al., 2015; ERIKSSON et al., 2017; HØIBY et al., 2017).

**Figura 5.** Ciclo do biofilme: (1) adesão de células planctônicas à superfície; (2) secreção de adesinas, matriz polimérica extracelular e proliferação celular; (3) formação de microcolônias e maturação do biofilme; (4) desprendimento celular, retornando à fase planctônica.



**Fonte:** Adaptado de Pereira, 2001.

Por meio da combinação entre colistina e CHIR-090 (inibidor *LpxC*) *in vitro* e *in vivo* contra biofilme formados por *P. aeruginosa*, Tan et al., (2017) comprovaram em quatro isolados susceptíveis à colistina, onde concentrações subinibitórias da combinação demonstrou a atividade sinérgica, contribuindo para erradicar as subpopulações da espécie e prevenir a formação de biofilme.

As infecções por biofilme podem aumentar o período de internação e a taxa de mortalidade de pacientes, além de promover elevados custos (KART et al., 2014). Conforme a atual escassez de antimicrobianos para erradicar infecções por isolados clínicos formadores de biofilme, é necessariamente urgente desenvolver uma alternativa de combatê-lo (RYBTKE et al., 2015; CIOFU et al., 2015).

### 2.3 Atividades biológicas de produtos naturais

A descoberta do primeiro antibiótico útil na década de 1930 representa um marco na investigação de novos fármacos, visto que uma crescente gama de microrganismos resistentes em ambiente hospitalar é bastante expressiva, limitando as opções terapêuticas (CARVALHO et al., 2011; MARMITT et al., 2015). Entretanto, há relatos antigos sobre o uso de plantas diante dos agravos existentes na época. Muitas vezes, fármacos com origem vegetal são poucos ou praticamente inexistentes como antimicrobianos, devido à confiabilidade da fonte derivada (COWAN, 1999).

No mundo, as IRAS são responsáveis pela incapacitação ou morte de pacientes, gerando grandes implicações financeiras e econômicas (PAZ; FORTES; SILVA, 2015; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Devido à alta incidência de isolados MDR envolvidos em IRAS, caracteriza-se uma redução abrupta na eficácia dos antimicrobianos usuais no tratamento dessas infecções (CRESS et al., 2014), sendo necessária a análise de novas substâncias mais potentes e menos tóxicas com caráter antimicrobiano.

Nas últimas décadas, diversos países utilizam espécies vegetais como método terapêutico de infecções (QUADRO 1) para produzir fármacos a partir de vegetais ou síntese de moléculas precursoras (CATÃO et al., 2014; CARVALHO, 2015; ELLER et al., 2015; MARMITT et al., 2015). No entanto, o uso de extratos ou derivados de vegetais com atividade antimicrobiana ainda é literalmente inexistente (SUBRAMANI; NARAYANASAMY; FEUSSNER, 2017).

**Quadro 1.** Extratos e derivados de espécies vegetais descritos entre os anos de 2005 a 2015 em isolados clínicos patogênicos multidroga-resistentes.

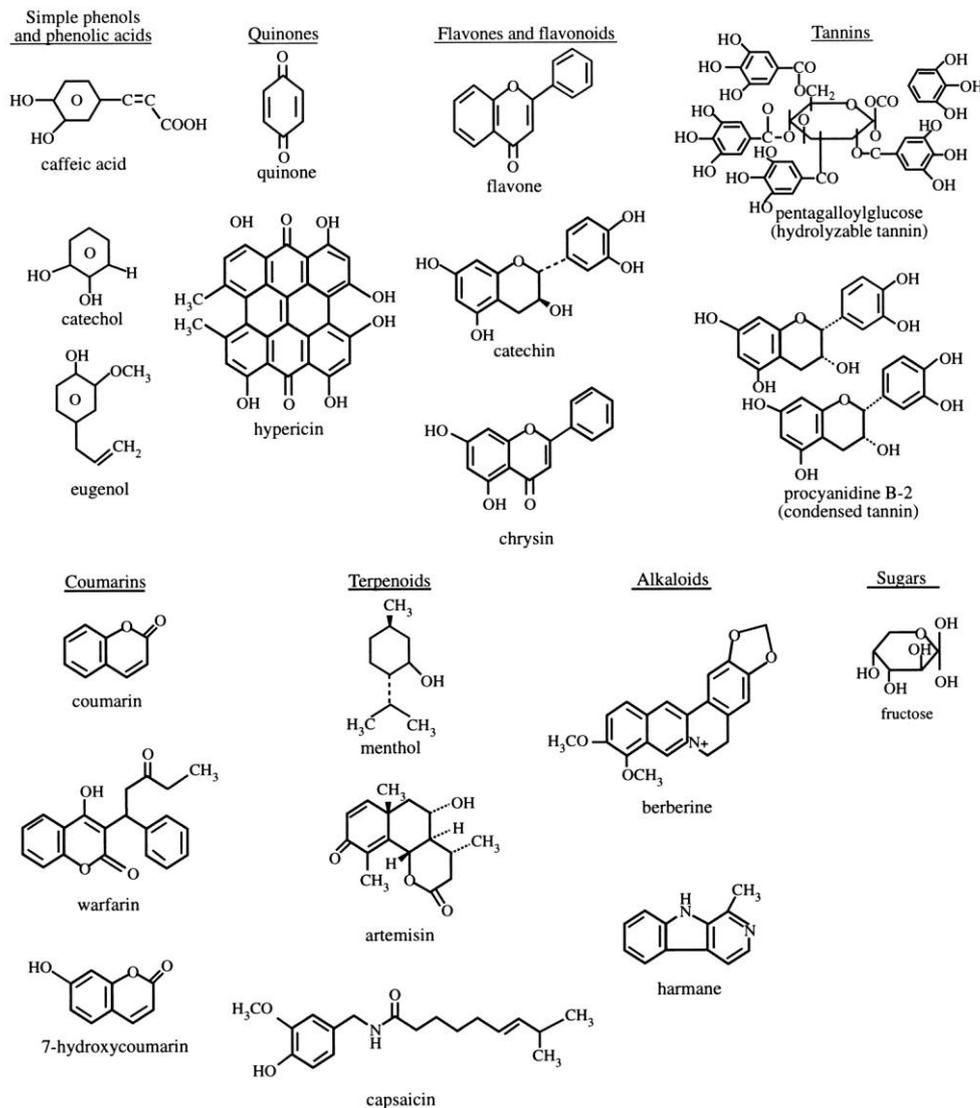
Planta	Alvos	Reportado	Referências
<i>Pinus elliottii</i> (pinheiro)	<i>S. aureus</i> MDR	Brasil	Leandro et al. 2014
<i>Alkanna tinctoria</i>	MRSA	Arábia Saudita	Khan et al. (2016)
<i>Rhazya stricta</i>	MRSA, <i>A. baumannii</i> MDR e <i>P. aeruginosa</i>	Paquistão	Khan et al. (2015)
<i>Anthocephalus cadamba</i> <i>Pterocarpus santalinus</i>	<i>Acinetobacter</i> sp. MDR e <i>P. aeruginosa</i>	Índia	Dubey et al. (2012)
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi.	MRSA	China	Chan et al. (2011)
<i>Swietenia mahagoni</i>	MRSA, <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i>	Bangladesh	Rahman et al. (2009)

Legenda: MRSA, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*S. aureus* resistente a metilicina); MDR, Multidroga-resistentes.

**Fonte:** Rahman et al., 2009; Chan et al., 2011; Dubey et al., 2012; Leandro et al., 2014; Khan et al., 2015; Khan et al., 2016.

A OMS descreve que o vegetal, medicinal ou não, possui “em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins de tratamento ou prevenção de agravos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (WHO 1998; BRASIL, 2006b). De fato, os vegetais produzem metabólitos secundários (FIGURA 6), responsáveis por diversos mecanismos de defesa contra patógenos, insetos e herbívoros (SUBRAMANI; NARAYANASAMY; FEUSSNER, 2017).

**Figura 6.** Fórmulas estruturais de substâncias/metabólitos secundários com atividade antimicrobiana obtidos de diversas espécies vegetais.



**Fonte:** Cowan, 1999.

A partir da determinação dos aspectos farmacobiológicos de extratos vegetais pela Química Medicinal, eles vêm adquirindo notoriedade como fontes promissoras de novos fármacos (CARVALHO, 2015; ELLER et al., 2015; MARMITT et al., 2015). Podem exibir propriedades químicas que favorecem ao desempenho de suas atividades biológicas: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, entre outras (BEZERRA et al., 2013). Grande parte das espécies vegetais possui princípios ativos com ação antimicrobiana, alguns com maior poder antimicrobiano

comparados aos demais, caracterizando-se como um fator protetivo à espécie vegetal.

Através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), foram estabelecidos critérios de acesso ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil (BRASIL, 2006a; MARMITT et al., 2015). No País, isso pode aprimorar estudos sobre extratos naturais, com a produção de fármacos com ação antimicrobiana, principalmente pelo País possuir a maior biodiversidade de plantas do mundo (FORZZA, et al 2010; CARVALHO, 2015).

Marmitt et al., (2015), através de uma revisão sistemática, apresentam os estudos clínicos sobre o potencial antimicrobiano de extratos naturais de plantas de interesse ao SUS entre 2010 e 2013. Essa análise resultou em 21.357 artigos encontrados. A partir desses resultados, os autores citam que são necessárias discussões sobre alternativas terapêuticas ao tratamento convencional de agravos bacterianos.

Em Pernambuco, há relatos sobre a atividade antimicrobiana de espécies vegetais (ALVES et al., 2016; BESSA et al., 2016). Em 2012, Silva et al. avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos dos frutos de *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* e *Pityrocarpa moniliformis* frente cepas padrão ATCC e isolados clínicos de *S. aureus*. Esses extratos apresentaram inibição no crescimento bacteriano, onde *L. ferrea* exibiu maior ação inibitória ( $p < 0,05$ ) com CIM variando entre 0.39 a 0.781 mg.mL<sup>-1</sup> e concentração bactericida mínima (CBM) de 3.12 a 6.25 mg.mL<sup>-1</sup>.

Em sua análise, Vieira et al. (2016) investigaram a atividade biológica de vegetais da Caatinga do Nordeste brasileiro contra *Trichomonas vaginalis*. Os extratos exibiram redução da viabilidade parasitária; no entanto, foi observada alta citotoxicidade *in vitro* e baixa seletividade (IS) ao parasita. Os autores indicam que um composto com alta citotoxicidade em células de mamíferos não deve ser descartado, configurando que este não é parâmetro exclusivo para avaliar um composto.

Outros estudos demonstram compostos com alta citotoxicidade *in vitro*. Isso não garante, necessariamente, resultados semelhantes *in vivo* (OLIVEIRA et al., 2017), além disso, o IS *in vitro* pode se mostrar inativo ou muito tóxico aos animais (MOHAMMED et al., 2014).

### 2.3.1 *Aniba riparia* (Nees) Mez e riparinas

A espécie *Aniba riparia* (Nees) Mez é um vegetal pertencente à família Lauraceae, composta por 52 gêneros e 3.000 espécies dispersas pelo mundo, sendo predominantemente encontradas em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, essa família é representada por 22 gêneros (ROHWER et al., 1972).

O gênero *Aniba* compreende 41 espécies de arbustos ou árvores de planície (FIGURA 7), localizados na Amazônia Central e na Guiana (CASTELO-BRANCO et al., 2000). Tipicamente, esta espécie é conhecida popularmente como “louro”, “louro-faia” e “pau-rosa” (BARBOSA et al., 1988; CASTELO-BRANCO et al., 2000).

**Figura 7.** Frutos verdes da espécie vegetal *Aniba riparia* (Nees) Mez.



Fonte: Atrium

O fruto verde e o cálice da *A. riparia* (Nees) Mez contêm diversos componentes orgânicos: flavonoides, neoligninas, estilpironas e alcaloides (BARBOSA-FILHO et al., 1987; CASTELO-BRANCO et al., 2000). Após o processo de extração e purificação podem ser isoladas as alcanidas, descritas como: riparina I, riparina II e riparina III (BARBOSA-FILHO et al., 1987), as quais possuem atividades biológicas de amplo espectro (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Comumente, a riparina III é o principal composto obtido da *A. riparia*, representando 34% dos compostos extraídos (BARBOSA-FILHO et al., 1987).

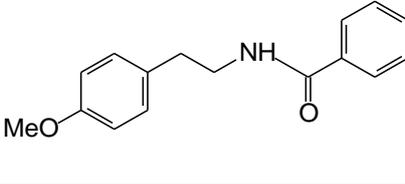
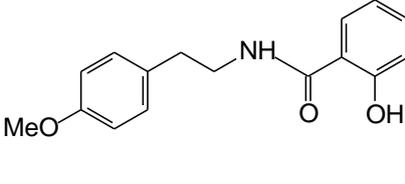
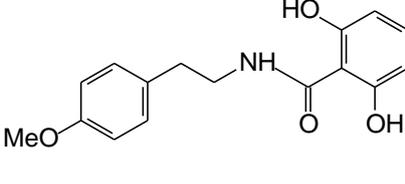
A riparina I, verificada no quadro 2, é quimicamente conhecida como éter metílico de N-benzoil-tiramina, (O-Metil)-N-benzoiltiramina ou N-[8'-(4'-metoxifeniletíl)]-benzoilamida. Possui atividades biológicas definidas: relaxante

muscular (THOMAS et al., 1994), antimicrobiana (BARBOSA et al., 1988; CATÃO et al., 2005; 2010), ansiolítica (SOUSA et al., 2005) e antidepressiva (SOUSA et al., 2014).

Quimicamente descrita como (*O*-Metil)-*N*-(2-hidroxibenzoil)-tiramina ou *N*-[8'-(4'-Metoxifeniletil)]-2-hidroxi-benzoilamida), a riparina II (QUADRO 2) detém diversas atividades biológicas: antimicrobiana (BARBOSA et al., 1988; CATÃO et al., 2005; 2010), ansiolítica (SOUSA et al., 2007) e antidepressiva (TEIXEIRA et al., 2011).

A riparina III (QUADRO 2), também conhecida como (*O*-Metil)-*N*-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina ou *N*-[8'-(4'-Metoxifeniletil)]-2,6-dihidroxi-benzoilamida exibe as seguintes atividades: antiespasmódica (CASTELO-BRANCO et al., 1991; THOMAS et al., 1994), relaxante muscular (THOMAS et al., 1994), antimicrobiana (BARBOSA et al., 1988; CATÃO et al., 2005; 2010), ansiolítica (MELO et al., 2006) e antidepressiva (VASCONCELOS et al., 2015).

**Quadro 2.** Descrição das características químicas e moleculares das riparinas I, II e III.

Nome	Classe Química	Fórmula Química	Solubilidade	Fórmula Estrutural
Riparina I	Benzoil-Tiramina	$C_{16}H_{17}NO_2$	Cremofor, DMSO, Tween 80	
Riparina II		$C_{16}H_{17}NO_3$		
Riparina III		$C_{16}H_{17}NO_4$		

Fonte: BARBOSA-FILHO et al., 1987.

Inicialmente, Barbosa-Filho et al. (1987) isolaram 25 componentes do fruto verde da *A. riparia* (Nees) Mez, provando sua atividade contra diversas espécies: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Salmonella gallinarum*, *Bacillus cereus*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*. No ano seguinte, Barbosa et al. (1988)

verificaram que extratos do cálice e fruto dessa espécie exibiram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *B. cereus*, *C. albicans* e *K. pneumoniae*, sendo inativos contra *Proteus* sp., *S. gallinarum* e *E. coli*.

Outras atividades também podem ser verificadas, como: antimalárica, esquistossomicida e moluscicida (CASTELO-BRANCO, 1992). Alguns estudos avaliaram a atividade antimicrobiana de riparinas (I, II e III) contra cepas de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *B. cereus* e *C. albicans*, sendo ressaltada sua ação antimicrobiana. Entretanto, os compostos não foram ativos em *E. coli*, *S. gallinarum* e *Proteus* sp. (BARBOSA et al., 1988).

Catão et al. (2005) confirmaram a atividade antimicrobiana de riparinas (I, II e III) em isolados de *S. aureus* e *E. coli*. Foram observados halos de inibição do crescimento semelhantes (9 mm) em *S. aureus*. Além disso, a riparina III eliminou o plasmídeo de resistência à penicilina (61.7%), sendo confirmado através do semeio das variantes sensíveis em BAB-penicilina e determinação da CIM por E-test, e houve modificação da expressão de fatores de virulência (CATÃO et al., 2010). Nas cepas de *S. aureus* e *E. coli* foi constatado que as riparinas, apesar de suas diferenças estruturais, apresentam semelhança na atividade biológica; em contrapartida, a riparina III expôs maior potencial antimicrobiano (CATÃO et al., 2005).

Através de sua síntese orgânica podem ser obtidos 14 tipos diferentes dessas alcaloides (riparina I até riparina XIV) (CATÃO et al., 2005). Por se tratar de uma classe especial de alcaloide, suas atividades químicas e biológicas vêm sendo definidas nos últimos anos, principalmente, devido à síntese de novos derivados das riparinas. Logo, a síntese e modificação de compostos derivados de espécies vegetais/plantas medicinais para obter novas estruturas com atividades farmacológicas continuam sendo um desafio frequente na Química Medicinal (RADJASA et al., 2011).

Outros estudos sobre as riparinas sintéticas (A, B, C, D, E e F) também demonstram diversas atividades biológicas *in vitro*. Em 2015, Silva et al. investigaram a propriedade anti-inflamatória da riparina A *in vivo*, um derivado semissintético. Este estudo confirmou sua ação anti-inflamatória, sugerindo ser um alvo importante na terapia de doenças inflamatórias. Santiago et al. (2015) avaliaram a riparina B em modelos de inflamação, dores em geral e sua ação antioxidante *in*

*vivo*. Esse composto inibiu as vias inflamatórias, indicando ser um importante componente farmacológico.

Sabe-se que alguns estudos descrevem a ação antimicrobiana das riparinas naturais I, II e III em cepas bacterianas e fúngicas; no entanto, é necessário investigar sua atividade antimicrobiana e antibiofilme em isolados clínicos MDR e formadores de biofilme de importância médica, bem como sua citotoxicidade e possíveis alterações morfológicas *in vitro*.

#### 2.4 Alterações ultraestruturais induzidas em agentes bacterianos

A microscopia eletrônica de transmissão e de varredura representam ferramentas importantes para avaliar a morfologia e ultraestruturas de microrganismos por imagens, podendo elucidar alvos celulares envolvidos nas interações bactéria-antimicrobianos e bactéria-composto (SIQUEIRA et al., 2014).

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) iniciou-se com o trabalho de Knoll, em 1935. Este microscópio é bastante importante em estudos na área biológica, devido ao detalhamento de estruturas finas de objetos pequenos, como: esporos de fungos, superfícies de folhas, morfologia e identificação de elementos químicos em amostra sólida, etc. (GRIMSTONE, 1980). Outra importância é a aparência tridimensional das imagens obtidas, podendo complementar as informações dadas pela imagem óptica (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Diversos estudos também utilizam o MEV, principalmente quanto à análise *in vitro* de espécies microbianas na presença de compostos (MATOS-ROCHA et al., 2016; MATOS-ROCHA et al., 2017; MOHMMED et al., 2017). Silva et al. (2012) confirmaram a atividade antimicrobiana de extratos dos frutos de *A. colubrina*, *L. ferrea* e *P. monilliformis* frente cepas padrão ATCC e isolados clínicos de *S. aureus*. Os resultados observados na MET e MEV sugerem que o principal alvo da ação desses extratos é a parede celular bacteriana, devido sua ondulação, espessura ou desprendimento, além da inibição da formação de biofilme.

Em 2015, Veras et al. caracterizaram as alterações ultraestruturais e morfológicas em isolados patogênicos e não-patogênicos de *K. pneumoniae* em Recife/PE. Por fim, concluíram que estes isolados sofrem mudanças ultraestruturais

quando submetidos à sub-CIMs de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, apesar da resistência fenotípica apresentada nos isolados analisados.

Vieira et al. (2016) investigaram a atividade contra *T. vaginalis* da *C. nummularius*, *M. rufula* e *S. lechriosperma*, as quais exibiram redução da viabilidade parasitária, e o ácido ursólico com padrão de 100% de redução. A MEV indicou efeitos na membrana parasitária, modificação da morfologia típica e surgimento de projeções e furos na membrana, além de ondulação e enrugamento.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Determinar a citotoxicidade, atividade antimicrobiana, antibiofilme e alterações ultraestruturais induzidas *in vitro* pelas riparinas I, II e III frente isolados clínicos bacterianos multidroga-resistentes.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a citotoxicidade das riparinas (I, II e III) e de antimicrobianos (oxacilina e meropenem) em células Vero;
- ✓ Analisar a ação hemolítica *in vitro* das riparinas (I, II e III) e de antimicrobianos (oxacilina e meropenem) em eritrócitos humanos;
- ✓ Investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* das riparinas I, II e III frente cepas padrão ATCC de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*;
- ✓ Verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* da riparina III frente isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*;
- ✓ Determinar a capacidade de formação do biofilme de isolados clínicos MDR que se mostrarem sensíveis à riparina;
- ✓ Definir a atividade antibiofilme da riparina III frente isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*;
- ✓ Verificar as alterações ultraestruturais induzidas *in vitro* pela riparina III em isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção das riparinas naturais I, II e III

As riparinas naturais I, II e III foram obtidas do fruto verde e cálice da *Aniba riparia*, pertencente à família Lauraceae. Estes compostos compõem a classe das alcanidas, os quais foram extraídos e purificados pelo Prof. Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí/UFPI.

### 4.2 Cepas padrão ATCC e isolados clínicos bacterianos

Nas análises foram utilizadas cepas bacterianas padronizadas para testes de resistência aos antimicrobianos pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017): *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Os isolados clínicos MDR foram obtidos em dois hospitais públicos do Recife/PE por demanda espontânea e vigilância entre 2013 e 2014 e estão estocados em glicerol a 20% em freezer com temperatura de -80°C, pertencendo à bacterioteca do Laboratório de Biologia Celular e Molecular no Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ/PE.

A identificação das espécies bacterianas e o perfil de resistência aos antimicrobianos foram determinados pelo sistema automatizado VITEK 2 (*Biomérieux*) e fornecidos pelos hospitais-fonte (APÊNDICE B). Para o estudo, foram selecionados cinco isolados clínicos MDR de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, os quais eram carreadores de genes de virulência e sem relação clonal (FREITAS, 2014; LIMA, 2015; MANGUEIRA, 2016; CAVALCANTI, 2017).

Para reativação bacteriana, 30  $\mu$ L do estoque de cada isolado clínico foram inoculados em caldo BHI para enriquecimento microbiano. Em seguida, foram incubados por 18-24h em estufa bacteriológica a 37°C $\pm$ 1. Após este período, foram semeados em meio de cultura ágar BHI e incubados em estufa a 37°C $\pm$ 1 por 18-24h para cultivo e isolamento bacteriano.

### 4.3 Citotoxicidade das riparinas I, II e III

A análise de citotoxicidade dos compostos naturais e dos antimicrobianos (oxacilina e meropenem) foi avaliada em linhagem celular Vero (oriundas do rim do macaco-verde africano) através da técnica do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), descrita por Mosmann (1983). Foi estimada a porcentagem de células viáveis em relação às células-controles. As células ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram semeadas em microplacas de 96 poços contendo meio RPMI com vermelho de fenol suplementado com 10% de soro fetal bovino, em seguida, foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C} \pm 1$ .

Após 24 h, o meio foi removido e as células incubadas na presença de diferentes concentrações dos compostos (400  $\mu\text{g/mL}$  a 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 h. Após este período, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e incubados por 3 h em estufa de  $37^\circ\text{C} \pm 1$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e sua absorbância foi definida por espectrofotometria a 540 nm (Benchmark plus, Bio-Rad®, Califórnia, EUA). Poços contendo meio RPMI e MTT foram utilizados como controle da reação. A concentração citotóxica ( $\text{CC}_{50}$ ) foi determinada por análise de regressão linear dos dados obtidos pelo *software* SPSS 18.0 para Windows. E cada ensaio foi realizado em quadruplicata em dois experimentos independentes.

### 4.4 Ação hemolítica das riparinas I, II e III

A ação hemolítica dos compostos naturais e dos antimicrobianos (oxacilina e meropenem) foi realizada através da técnica sobre hemácias do tipo O+, descrita por Becerra et al. (2012). A diluição das riparinas I, II e III foi realizada com DMSO, seguida pela microdiluição seriada com solução salina (NaCl 0,85% e  $\text{CaCl}_2$  10 nM) em microplacas de 96 poços, contendo poliestireno e fundo "U".

Em paralelo, 2 mL de sangue total homogeneizado foram dissolvidos em 18 mL de solução salina (NaCl 0,85% e  $\text{CaCl}_2$  10 nM). Após, foi centrifugado a 2.500 rpm por 2 min. O sobrenadante foi desprezado, com repetição dessa etapa por 3 vezes. Cada poço continha solução eritrocitária a 2% e o composto dissolvido. Foi adicionado um controle positivo de lise celular com Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co.,

St. Louis, MO, USA) a 1% e um controle negativo, células em solução salina. Após incubação por 3 h a 37°C sob agitação constante, as microplacas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 4 min a 4°C, para separação entre o sobrenadante e o *pellet*.

Por fim, o sobrenadante foi removido para outra placa de 96 poços com poliestireno e fundo “U” para leitura em espectrofotômetro (Benchmark plus, Bio-Rad®, Califórnia, EUA) a 540 nm para estimar o percentual de hemólise. Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata e utilização do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 39858214.2.0000.5208. Os resultados foram expressos como porcentagem de hemólise determinada através da equação:

$$\text{Ação hemolítica (\%)} = \frac{(\text{Abs. do tratado} - \text{Abs. do controle negativo}) \times 100}{(\text{Abs. do controle positivo} - \text{Abs. do controle negativo})}$$

#### 4.5 Atividade antimicrobiana das riparinas I, II e III

A atividade antimicrobiana das riparinas foi analisada pela técnica de microdiluição em caldo em microplaca de poliestireno (48 poços). As riparinas I, II e III foram testadas nas seguintes concentrações: 400 µg/mL a 3,125 µg/mL (CATÃO et al., 2010). Todas as moléculas foram diluídas em solução de DMSO para obter uma solução final com concentração de DMSO não tóxica às células bacterianas (1%). Para garantir a estabilidade dos compostos, a solução inicial foi preparada durante a montagem dos experimentos com adição de controle negativo.

Após 18-24h de incubação da concentração bacteriana ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) em estufa bacteriológica a  $37^\circ\text{C} \pm 1$ , foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) das riparinas naturais I, II e III contra as cepas padrão ATCC de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. A concentração bactericida mínima (CBM) foi validada através do semeio das concentrações em meio de cultura ágar BHI e incubadas por 18-24h a  $37^\circ\text{C} \pm 1$ , com posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Em seguida, apenas todos os isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii* foram utilizados no estudo devido à susceptibilidade à

riparina III.

Em paralelo, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  do revelador resazurina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) em cada poço da microplaca para analisar a viabilidade celular bacteriana por meio da colorimetria. No decorrer de 2 h, a presença da cor azul representa a ausência do crescimento de células bacterianas e a cor rosa, resulta na presença do crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

#### 4.6 Formação de biofilme dos isolados multidroga-resistentes

A quantificação de biofilme foi observada pela técnica descrita por Stepanović et al. (2000), com adaptações. Todos os isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii* susceptíveis à riparina III foram testados quanto à formação de biofilme. Em microplacas (96 poços) foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  das suspensões bacterianas ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) e incubadas por 24h a  $37^\circ\text{C} \pm 1$ . Como controle positivo, foi utilizada a cepa K483 (FREITAS, 2014), padronizada no laboratório para ensaios de biofilme.

Suspensões bacterianas foram removidas, seguida por lavagens com 200  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril e depósito das microplacas em temperatura (55-60°C) para secagem por 40-60 min. Após este período, foi adicionado o cristal violeta por 15 min, seguida por lavagens por imersão em água. Nas microplacas secas foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol (P.A.) por 30 min para fixação. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância em 570 nm (Benchmark plus, Bio-Rad®, Califórnia, EUA).

As amostras foram descritas, baseadas nos critérios de Stepanović et al. (2000). O valor das densidades óticas ( $\text{DO}_i$ ) de cada isolado foi obtido por média dos poços, sendo este valor comparado à densidade ótica do controle negativo ( $\text{DO}_c$ ). Os isolados foram classificados em quatro categorias, de acordo com a média das  $\text{DO}_i$  relacionadas aos resultados obtidos para a  $\text{DO}_c$ : não aderente ( $\text{DO}_i \leq \text{DO}_c$ ), fracamente aderente ( $\text{DO}_c < \text{DO}_i \leq 2 \times \text{DO}_c$ ), moderadamente aderente ( $2 \times \text{DO}_c < \text{DO}_i \leq 4 \times \text{DO}_c$ ), ou fortemente aderente ( $4 \times \text{DO}_c < \text{DO}_i$ ).

#### 4.7 Atividade antibiofilme da riparina com ação antimicrobiana

A atividade antibiofilme foi analisada com a riparina III nos isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*, sendo testado em isolados formadores de biofilme, com adaptação da metodologia descrita por Stepanović et al. (2000). Foram selecionados dois isolados clínicos de *S. aureus* (170 e 184) devido à resistência à oxacilina e ciprofloxacina, além da presença de genes de virulência: *icaAD*, *hlg*, *tst* e *luk* (MANGUEIRA, 2016). Os dois isolados clínicos de *A. baumannii* (54 e 808) foram selecionados por apresentarem resistência à colistina, imipenem e meropenem, sendo carreadores dos genes de virulência: *csuE*, *ompA*, *basC* e *pilA* (CAVALCANTI, 2017).

O meio de cultura BHI sem a presença da riparina foi utilizado como controle negativo. E como controle positivo, a cepa K483. Em microplaca (48 poços), foi adicionado um total de 200  $\mu$ L em cada poço (meio de cultura, composto testado e inóculo ajustado) e 1 cm de cateter estéril. Após o período de incubação ( $37^{\circ}\text{C}\pm 1/24\text{h}$ ), este cateter foi retirado, lavado com água destilada estéril e fixado em tampão fosfato 0.1 M para processamento e visualização em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV.

Em paralelo, as suspensões bacterianas foram removidas, lavados com solução salina estéril e secados em  $55\text{-}60^{\circ}\text{C}$  por 40-60 min. Após, foi adicionado o cristal violeta por 15 min e lavagem por imersão em água. Em seguida, na microplaca foi adicionado o etanol (P.A.) por 30 min e espectrofotometria a 570 nm (Benchmark plus, Bio-Rad®, Califórnia, EUA). A média dos valores das densidades óticas ( $\text{DO}_i$ ) de cada isolado foi classificada (STEPANOVIĆ et al., 2000), à qual foi comparada à densidade ótica do controle negativo ( $\text{DO}_c$ ).

#### 4.8 Análise das alterações ultraestruturais induzidas *in vitro* por microscopia eletrônica de varredura

Foram selecionados dois isolados clínicos MDR e a cepa padrão ATCC de *S. aureus* e *A. baumannii* susceptível à riparina III. Estes foram submetidos à sub-CIMs por 18h, sendo 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para a cepa padrão ATCC e os isolados de *S. aureus* e

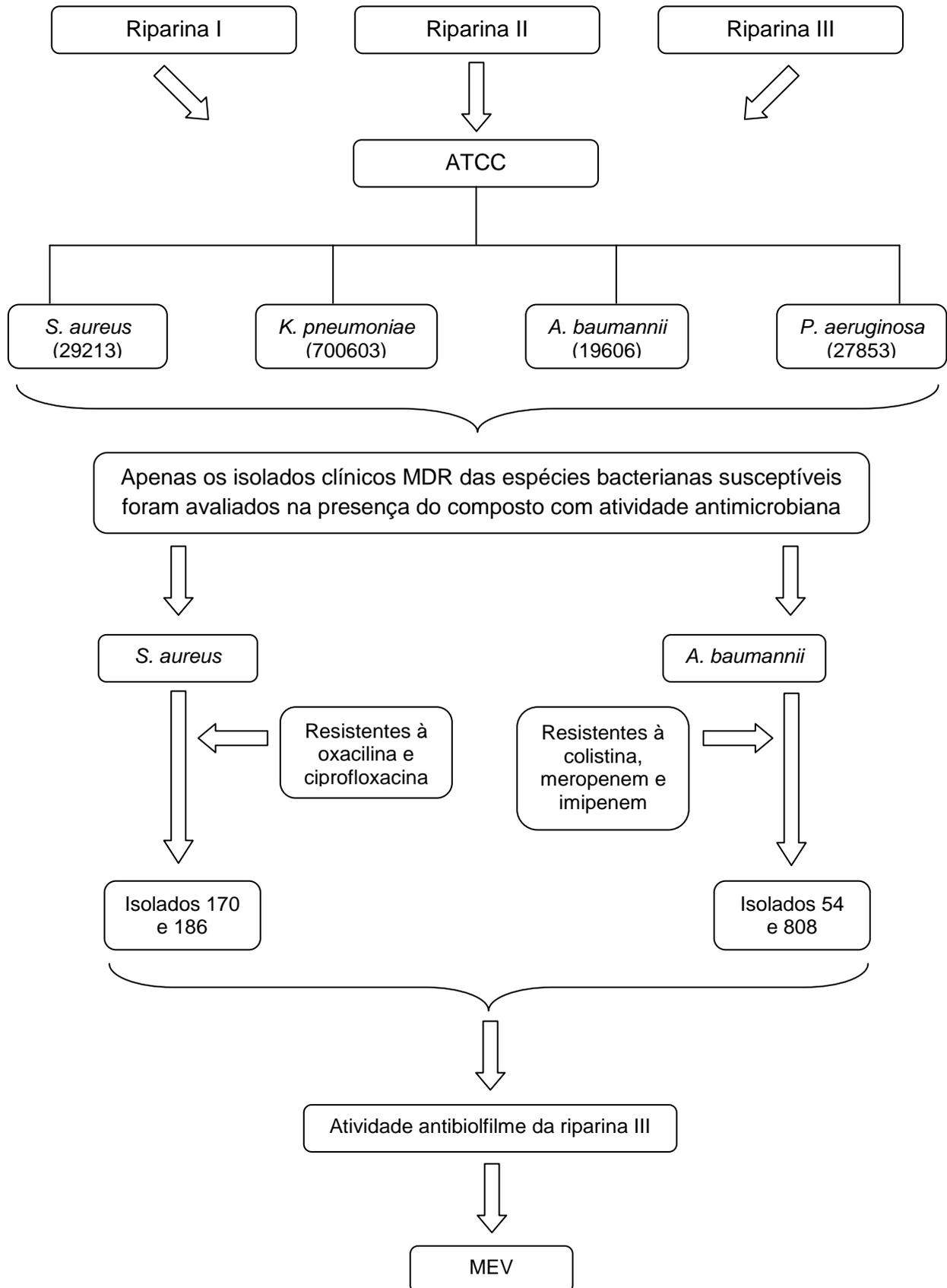
200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para a cepa padrão ATCC e isolados clínicos de *A. baumannii*, com adição de controle negativo nas mesmas condições sem a presença dos compostos.

Todos os isolados foram lavados em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) para posterior fixação em tampão fosfato 0,1 M e glutaraldeído a 2,5%. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1 M por 90 min. Em seguida, foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1 M para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 100% por 10 min cada etapa. Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por  $\text{CO}_2$ , obtendo-se a secagem do material para montagem do material seco em *stubs* metálicos utilizando uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foi realizada a metalização, cobrindo o material por uma fina camada de ouro, para visualização em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV.

#### 4.9 Análise estatística

A concentração citotóxica foi determinada por análise de regressão linear utilizando o programa SPSS 18.0 (IBM Co., New York, USA) para Windows. A análise de significância da atividade antibiofilme da riparina III, considerando significativo valores  $p < 0.05$ , foi descrita por ANOVA e pós-teste T de *Student* usando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, California, USA) para Windows.

## 4.10 Fluxograma



## 5 RESULTADOS

**Artigo submetido à Revista Planta Médica:** Atividade antimicrobiana e antibiofilme das riparinas (I, II e III) e alterações ultraestruturais em isolados bacterianos multidroga-resistentes de espécies de importância médica.

### Introdução

Compostos naturais de origem vegetal são bastante utilizados pela medicina alternativa no tratamento de infecções [ELLER et al., 2015]. Estima-se a existência de 500.000 espécies vegetais no mundo, sendo 20% desta biodiversidade encontrada no Brasil [FORZZA et al 2010]. Em consequência de seu emprego na terapêutica popular, os compostos vêm adquirindo notoriedade, produzindo fármacos a partir de extratos e síntese de moléculas precursoras [ELLER et al., 2015; MARMITT et al., 2015]. As propriedades químicas de compostos vegetais contribuem ao desempenho de suas atividades biológicas, incluindo antibacteriana e antifúngica [MARMITT et al., 2015; ALVES et al., 2016], tornando indispensável analisar a ação antimicrobiana de compostos vegetais, visto à diminuição das opções de tratamento das infecções.

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) permanecem como uma preocupação mundial envolvendo, principalmente, a identificação de espécies bacterianas multidroga-resistentes (MDR) aos antimicrobianos disponíveis, compreendendo *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; RENNERT et al., 2017), além de sua capacidade em formar biofilme, levando a infecções persistentes e recorrentes (DI DOMENICO et al., 2017). Isso se torna um agravante à terapêutica, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro e à pressão seletiva bacteriana [SHARLAND; SAROEY; BEREZIN, 2015; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016], reduzindo a eficácia de antimicrobianos disponíveis. Adicionalmente, as infecções envolvendo biofilmes bacterianos podem aumentar o período de internação e a taxa de mortalidade de pacientes, além de promover elevados custos aos pacientes e ao Governo [KART et al., 2014; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; KAYE; GALES; DUBOURG, 2017].

As riparinas naturais são compostos obtidos do fruto verde e cálice da *Aniba riparia* [BARBOSA-FILHO et al., 1987], predominantemente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, como na região amazônica do Brasil e popularmente conhecida como “louro” [BARBOSA et al., 1998]. Possuem amplo espectro de atividades biológicas descritas, como: antimicrobiana, antiespasmódico, ansiolítica e antidepressiva [BARBOSA-FILHO et al., 1987; THOMAS et al., 1994; CATÃO et al., 2005; MELO et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2011].

A atividade antimicrobiana das riparinas naturais I, II e III foi determinada anteriormente por métodos quantitativos frente cepas padrão ATCC de *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* e *K. pneumoniae* e por método qualitativo em isolados MDR de *S. aureus* e *Escherichia coli* [BARBOSA et al., 1988; CATÃO et al., 2005]. As riparinas I, II e III também já foram avaliadas quanto à ação na eliminação de plasmídeos de resistência em *S. aureus* sensível à meticilina, onde a riparina III apresentou potencial de eliminação dos plasmídeos de resistência à penicilina em 61.7% dos isolados. Porém, as riparinas naturais I, II e III não foram avaliadas quanto sua atividade antimicrobiana e antibiofilme, além de possíveis alterações ultraestruturais induzidas *in vitro* em isolados clínicos MDR e elucidação dos mecanismos de ação das riparinas naturais I, II e III.

Visto à diminuição da eficácia dos antimicrobianos disponíveis face a alta disseminação de resistência bacteriana, este estudo visa investigar a atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica de riparinas (I, II e III), e análise de alterações ultraestruturais *in vitro* frente isolados clínicos MDR de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, fornecendo contribuições para estudos que visem o desenvolvimento de novas opções terapêuticas de IRAS.

## Resultados

As riparinas I, II e III foram testadas quanto à citotoxicidade frente células de mamífero de linhagem Vero. A riparina II apresentou a concentração citotóxica em 50% das células (CC<sub>50</sub>) de 174.3 µg/mL, sendo considerado o composto com menor toxicidade, seguido pela riparina I (144.1 µg/mL) e riparina III (142.0 µg/mL). Os antimicrobianos oxacilina e meropenem exibiram concentrações citotóxicas ligeiramente menores comparados às riparinas, 162.9 µg/mL e 182.7 µg/mL,

respectivamente. A ação hemolítica das riparinas foi verificada em eritrócitos humanos, as quais se mostraram com baixo percentual hemolítico, variando de 8,61% a 25,99%. Já os antimicrobianos avaliados apresentaram a hemólise de 17,57% para oxacilina e 10,88% para meropenem (Fig. 1).

A concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM) das riparinas I, II e III foi determinada por microdiluição em caldo. Na análise, somente a riparina III apresentou atividade antimicrobiana a partir de 50  $\mu\text{g/mL}$  frente cepa padrão ATCC de *S. aureus* e em *A. baumannii* somente na maior concentração testada (400  $\mu\text{g/mL}$ ). Em seguida, a riparina III foi avaliada apenas em isolados clínicos MDR das respectivas espécies bacterianas e concentrações susceptíveis. Este composto exibiu atividade antimicrobiana em todos os cinco isolados MDR de *S. aureus* nas concentrações testadas, apresentando CIM e CBM de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Dos cinco isolados MDR de *A. baumannii*, três foram susceptíveis à riparina III apenas na maior concentração testada, apresentando MIC e MBC de 400  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 2).

A atividade antibiofilme da riparina III foi determinada apenas em isolados clínicos MDR e formadores de biofilme susceptíveis à riparina III. Inicialmente, todos os isolados clínicos MDR de *S. aureus* foram classificados como moderados formadores de biofilme, enquanto todos os isolados clínicos MDR de *A. baumannii* foram descritos como fortes formadores de biofilme. Através da análise das densidades óticas dos isolados ( $\text{DO}_i$ ) comparadas às densidades óticas dos controles ( $\text{DO}_c$ ), observou-se que a presença da riparina III inibiu significativamente a formação do biofilme de todos os isolados de *S. aureus* avaliados, classificados posteriormente como fracos formadores de biofilme ( $\text{DO}_c < \text{DO}_i \leq 2x \text{DO}_c$ ). Já nos isolados de *A. baumannii*, a riparina III induziu a formação do biofilme, onde estes isolados permaneceram como fortes formadores de biofilme ( $4x \text{DO}_c < \text{DO}_i$ ) (Fig. 3).

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode-se observar células-controle de *S. aureus* e *A. baumannii* com superfície intacta sem alterações morfológicas. As cepas de *S. aureus* não submetidas à riparina III exibiram estruturas em cocos agrupados, semelhantes a cachos de uvas, e as cepas de *A. baumannii* foram observadas com morfologia de cocobacilos. As células-controle expostas ao DMSO comprovaram que a concentração utilizada do solvente (1%) não interferiu na proliferação ou estrutura e morfologia bacteriana (Fig. 4A-4B). Em isolados de *A. baumannii* expostos à riparina III foi observada uma redução do

número de células e alterações morfológicas aparentes, como a existência de células alongadas sem visualização do septo bacteriano, além de inúmeras células com aspecto rugoso acentuado na superfície celular (Fig. 4C-4E). Verificou-se uma alteração da morfologia em *S. aureus* tratada com riparina III, sendo observadas células bacterianas com formato de “lágrima”, além de extravasamento de material citoplasmático e rompimento celular (lise celular), bem como protuberâncias e rugosidade acentuada na superfície da parede celular (Fig. 4D-4F).

## Discussão

Uma revisão sistemática sobre o potencial antimicrobiano de extratos vegetais de interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) entre 2010 e 2013 encontrou 21.357 artigos citando que são necessárias discussões sobre alternativas terapêuticas ao tratamento convencional de agravos bacterianos [MARMITT et al., 2015].

Há poucos relatos da ação antimicrobiana das riparinas I, II e III em espécies bacterianas. Nossos dados demonstram a atividade antimicrobiana da riparina III frente isolados MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*. Estudos anteriores descrevem a atividade antimicrobiana de extratos do cálice e frutos verdes da *A. riparia* em cepas bacterianas e fúngicas [BARBOSA-FILHO et al., 1987; BARBOSA et al., 1988]. O presente estudo confirma estes dados, no entanto, traz ainda, o primeiro relato sobre a atividade antimicrobiana da riparina III frente isolados clínicos MDR de *S. aureus* resistentes à oxacilina, ciprofloxacina e portadores de genes de virulência (dados não publicados), além de isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes à colistina, meropenem e imipenem.

Dentre as espécies analisadas, *S. aureus* e *A. baumannii* foram susceptíveis às concentrações testadas da riparina III. De acordo com a literatura, as espécies Gram-positivas são mais sensíveis quando submetidas a extratos vegetais, comparadas às espécies Gram-negativas [FERREIRA et al., 2010], devido à dupla membrana apresentada pelas bactérias Gram-negativas, a qual é responsável pela resistência microbiana aos extratos vegetais [FRANCESCATO, 2007; FERREIRA et al., 2010]. Apesar da maior resistência de bactérias Gram-negativas a extratos vegetais, em nosso estudo foi observado sensibilidade em isolados de *A. baumannii* submetidos à riparina III na maior concentração testada, incluindo isolados

portadores de multidroga-resistência. Esse resultado assemelha-se aos obtidos por outros autores que também observaram pouca ação antimicrobiana da *A. riparia* contra agentes bacterianos Gram-negativos [BARBOSA et al., 1988; CATÃO et al., 2005].

A citotoxicidade das riparinas foi determinada pela técnica do MTT em células da linhagem Vero, à qual é amplamente utilizada para medir a proliferação celular e a citotoxicidade em diferentes linhagens celulares [JO et al., 2015; SASHIDHARA et al., 2015; SILVA et al., 2016]. As riparinas naturais I, II e III apresentaram concentrações citotóxicas similares (144.1  $\mu\text{g/mL}$ , 174.3  $\mu\text{g/mL}$  e 142.0  $\mu\text{g/mL}$ ) respectivamente, comparadas aos antimicrobianos de primeira escolha oxacilina (162.9  $\mu\text{g/mL}$ ) e meropenem (182.7  $\mu\text{g/mL}$ ). Segundo Bunel et al. [2014], esta técnica pode ou não completar a análise de determinado composto, sendo a primeira etapa de ensaios *in vitro*. Em estudos que visam investigar a atividade biológica de compostos vegetais, a toxicidade deve ser relacionada às linhagens celulares *in vitro*, principalmente observando as concentrações adequadas e tempos de incubação [BUNEL et al., 2014]. Contudo, caso o composto natural apresente alta concentração citotóxica *in vitro*, isso não garante, necessariamente, resultados semelhantes *in vivo* [OLIVEIRA et al., 2017].

Na pesquisa realizada por Yamaguchi & Veiga-Junior [2013] observou-se baixo percentual de viabilidade celular de óleos essenciais de folhas e galhos de *Endlicheria citriodorapela* (Lauraceae) pela técnica do MTT comparado ao controle, variando entre 72,6% e 109,8%, além de baixa atividade hemolítica (1,22 - 625  $\mu\text{g/mL}$ ). Em nossa análise, o percentual de viabilidade celular na presença das riparinas variou entre 36,44% a 76,08%, onde não atingiram 50% de citotoxicidade. O baixo percentual hemolítico das riparinas sugere que estas não causam danos às membranas dos eritrócitos humanos. A estabilidade da membrana eritrocitária é referência para observar a ausência de danos provocados por compostos em triagens de citotoxicidade [SHARMA; SHARMA, 2001]. Isso indica que análises devem ser realizadas com riparina III, já que exibe baixo percentual hemolítico em eritrócitos humanos nas concentrações testadas.

Os isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii* avaliados neste estudo são moderados e fortes formadores de biofilme, respectivamente. A formação de biofilme torna-se extremamente relevante às diversas espécies bacterianas por

assegurar sua sobrevivência em condições ambientais hostis, na presença de antimicrobianos e na ação de fagócitos [ERIKSSON et al., 2017]. Devido a pouca disponibilidade de antimicrobianos eficazes para erradicar ou minimizar infecções por isolados com alto potencial de virulência, é necessário desenvolver uma alternativa para combater este mecanismo [CIOFU et al., 2015; RYBTKE et al., 2015]. Não há estudos anteriores sobre a análise da atividade antibiofilme das riparinas I, II ou III, sendo este o primeiro relato da interferência da riparina III na formação de biofilme de *S. aureus*.

A MEV tem sido utilizada na observação da atuação extracelular de agentes fagocitários, antimicrobianos e compostos vegetais em isolados bacterianos [LAI et al., 2011; SILVA et al., 2013; VERAS et al., 2015]. Entretanto, nenhuma pesquisa anterior descreveu as possíveis alterações morfológicas em *S. aureus* e *A. baumannii* submetidas à riparina III. Neste estudo, foram observadas alterações morfológicas nas espécies bacterianas expostas por 18h à riparina III similares a estudos que descrevem a ação de antimicrobianos em espécies bacterianas, como descritas por Monson et al. [2010], Siqueira et al. [2014] e Veras et al. [2015]. Isso pode indicar que a riparina III possui o sítio de ação semelhante aos descritos em estudos com antimicrobianos disponíveis frente espécies bacterianas.

Zajmi et al. [2015] compararam as alterações ultraestruturais de *S. aureus* tratados com estreptomicina (composto sintético) e artonina E (composto natural). As micrografias de MEV apresentaram diversos danos na parede celular bacteriana, incluindo ruptura celular parcial e total, além da detecção de materiais filamentosos extracelulares. Outro estudo analisou as alterações ultraestruturais causadas por polimixina B e meropenem e a associação entre polimixina B e meropenem em dois isolados MDR de *K. pneumoniae* carreadores de gene *bla<sub>KPC-2</sub>* [SCAVUZZI et al., 2016]. Os autores relatam uma significativa redução no número de células bacterianas, além de diversas modificações morfológicas, incluindo formas ovais e esféricas, bem como formas aberrantes ou indefinidas e alongamento celular, e de perda de material citoplasmático confirmado por microscopia eletrônica transmissão. Estes dados se assemelham aos descritos em nosso estudo, no qual foram verificadas alterações morfológicas, como alongamento celular, aspecto rugoso, formato de “lágrima”, rompimento celular (lise celular), protuberâncias na superfície celular, bem como redução significativa nas células bacterianas.

A partir do desenvolvimento deste estudo entende-se que compostos vegetais devem ser analisados criteriosamente quanto sua atuação em espécies bacterianas MDR, face a alta disseminação de resistência bacteriana. Assim, percebeu-se que a riparina III apresenta atividade antimicrobiana frente isolados clínicos carreadores de genes de resistência e virulência, além de promover diversas alterações morfológicas e possuir potencial de inibição da formação de biofilme em isolados de *S. aureus*, indicando possíveis análises de novas opções terapêuticas das IRAS envolvidos *S. aureus*.

## **Materiais e métodos**

### Obtenção das riparinas naturais I, II e III

As riparinas naturais I, II e III foram obtidas do fruto verde e cálice da *Aniba riparia*, pertencente à família Lauraceae, segundo a metodologia estabelecida no Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí/UFPI.

### Cepas padrão ATCC e isolados clínicos

As riparinas I, II e III foram testadas frente cepas padrão ATCC de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Cinco isolados clínicos MDR de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* foram obtidos de dois hospitais públicos do Recife/PE por demanda espontânea e vigilância entre 2013 e 2014, sem contato com pacientes ou prontuários médicos, descritos na figura 5. A identificação bacteriana e a determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos obtidos pelo sistema automatizado VITEK 2 (*Biomérieux*) foram fornecidos pelos hospitais-fonte. Os isolados bacterianos estão estocados em glicerol a 20% em temperatura de -80°C na bacterioteca do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Departamento de Parasitologia no Instituto Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ/PE. No estudo foram incluídos cinco isolados clínicos MDR sem relação clonal de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

### Ensaio do MTT

O teste de citotoxicidade das riparinas naturais (I, II e III) e dos antimicrobianos (oxacilina e meropenem) foi realizado em células de mamíferos da linhagem Vero através da técnica do sal do tetrazólio - MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), descrita por Mosmann (1983). As células ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram adicionadas em microplacas de 96 poços contendo RPMI com vermelho de fenol suplementado com 10% de soro fetal bovino. Em seguida, as células foram incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, sendo posteriormente tratadas com riparinas I, II e III em diferentes concentrações (400 µg/mL a 3,125 µg/mL) por 24h [CATÃO et al., 2010]. Em seguida, foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL) por 3h a 37°C. Cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e sua absorbância foi medida a 540 nm em espectrofotômetro (Benchmark plus - Bio-Rad®, Califórnia, EUA). Cada ensaio foi realizado em quadruplicata em dois experimentos independentes.

### Teste de hemólise

A ação hemolítica (CAAE: 39858214.2.0000.5208) foi descrita por Becerra et al. [2012] nas concentrações das riparinas: 400 µg/mL a 3,125 µg/mL [CATÃO et al., 2010], e realizada em dois experimentos independentes em quadruplicata. As riparinas naturais (I, II e III) e os antimicrobianos (oxacilina e meropenem) foram solubilizadas em DMSO e diluídas em solução salina (NaCl 0,85% e CaCl<sub>2</sub> 10 nM) em microplacas de 96 poços. Paralelamente, 2 mL de sangue total homogeneizado foram dissolvidos em solução salina e centrifugado a 2.500 rpm por 2 min. Após incubação por 3 h a 37°C sob agitação constante, as microplacas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 4 min a 4°C. O sobrenadante foi removido para outra microplaca para leitura de absorbância em espectrofotômetro a 540 nm para estimar o percentual de hemólise através da equação: % = (Absorbância do tratado - Absorbância do controle negativo) x 100/ (Absorbância do controle positivo - Absorbância do controle negativo).

### Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

Inicialmente as riparinas naturais I, II e III foram testadas frente cepas padrão ATCC de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Em seguida, a

concentração bacteriana ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) dos isolados clínicos MDR das espécies susceptíveis foram submetidos à presença do composto avaliado. As riparinas foram diluídas em DMSO para realização da técnica de microdiluição em caldo nas concentrações: 400  $\mu\text{g/mL}$  a 3.125  $\mu\text{g/mL}$  [CATÃO et al., 2010], adaptado dos padrões estabelecidos pelo CLSI [2017]. Após incubação por 18-14h a  $37^\circ\text{C} \pm 1$  as concentrações que apresentaram atividade antimicrobiana foram semeadas em ágar BHI e incubadas por 18-24h a  $37^\circ\text{C} \pm 1$  para realizada da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), seguida pela análise de teste colorimétrico com adição de 20  $\mu\text{L}$  de resazurina [PALOMINO et al., 2002].

#### Formação de biofilme

A análise da formação do biofilme foi adaptada da técnica descrita por Stepanović et al. [2000]. Todos os isolados susceptíveis às riparinas foram testados quanto à formação de biofilme. Em microplacas (96 poços) foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  das suspensões bacterianas e incubadas por 24h a  $37^\circ\text{C} \pm 1$ . Suspensões foram removidas, seguida por lavagens com salina estéril (200  $\mu\text{L}$ ) e secagem. Em seguida, foi adicionado o cristal violeta por 15 min e lavagens com água. Nas microplacas secas foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol (P.A.) por 30 min e leitura da absorbância em 570 nm (Benchmark plus, Bio-Rad®, Califórnia, EUA). Os isolados foram classificados em: não aderente ( $\text{DO}_i \leq \text{DO}_c$ ), fracamente aderente ( $\text{DO}_c < \text{DO}_i \leq 2 \times \text{DO}_c$ ), moderadamente aderente ( $2 \times \text{DO}_c < \text{DO}_i \leq 4 \times \text{DO}_c$ ), ou fortemente aderente ( $4 \times \text{DO}_c < \text{DO}_i$ ).

#### Atividade antibiofilme

A técnica de atividade antibiofilme foi descrita por Stepanović et al. [2000], com adaptações. Apenas o composto com atividade antimicrobiana em isolados clínicos MDR foi testado em isolados formadores de biofilme. Os dois isolados de *S. aureus* (170 e 184) foram selecionados devido à resistência à oxacilina, ciprofloxacina e a presença de genes de virulência: *icaAD*, *hlg*, *tst* e *luk* (dados não publicados). Os dois isolados clínicos de *A. baumannii* (54 e 808) incluídos apresentam resistência à colistina, imipenem e meropenem, sendo carreadores dos genes de virulência: *csuE*, *ompA*, *basC* e *pilA* (dados não publicados). Em microplaca (96 poços), foi adicionado 1 cm de cateter estéril embebido por 200  $\mu\text{L}$  da solução: meio de cultura,

riparina III e inóculo ajustado. Após o período de incubação ( $37^{\circ}\text{C}\pm 1/24\text{h}$ ), o cateter foi retirado, lavado com tampão fosfato 0,1M e fixado. Em paralelo, as suspensões bacterianas foram removidas das microplacas, lavadas com solução salina estéril e secadas em  $55\text{-}60^{\circ}\text{C}$  por 40-60 min. Em seguida, foi adicionado o cristal violeta por 15 min e lavagem por imersão em água. Logo, na microplaca foi adicionado o etanol (P.A.) por 30 min e leitura em espectrofotometria a 570 nm (Benchmark plus, Bio-Rad®, Califórnia, EUA). A média dos valores das densidades óticas ( $\text{DO}_i$ ) de cada isolado foi classificada [STEPANOVIĆ et al., 2000], à qual foi comparada à densidade ótica do controle negativo ( $\text{DO}_c$ ).

#### Microscopia eletrônica de varredura

Foram selecionados dois isolados clínicos MDR de cada espécie susceptível ao composto com atividade antimicrobiana frente os isolados clínicos. Estes foram submetidos à sub-CIMs por 18h, sendo  $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$  para os isolados de *S. aureus* e  $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$  para *A. baumannii*. Todos os isolados foram lavados em tampão fosfato 0,1 M (pH, 7,4) para posterior fixação em tampão fosfato 0,1 M e glutaraldeído a 2,5%. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1 M por 90 min. Em seguida, foram lavados em tampão fosfato 0,1 M para posterior desidratação com etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) por 10 min cada etapa. Após foi realizado o ponto crítico e posterior montagem em *stubs* metálicos utilizando uma fita dupla face de carbono [VERAS et al., 2015]. Em seguida, foi realizada a metalização com uma fina camada de ouro para visualização em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV.

#### Análise estatística

A concentração citotóxica foi determinada por análise de regressão linear utilizando o programa SPSS 18.0 (IBM Co., New York, USA) para Windows. A análise de significância da atividade antibiofilme da riparina III, considerando significativo valores  $p < 0.05$ , foi descrita por ANOVA e pós-teste T de *Student* usando o programa GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, California, USA) para Windows.

## Referências

- Alves RCC, das Mercês PFF, de Souza IRA, de Almeida CMA, da Silva APS, Lima VLM et al. Antimicrobial activity of seaweeds of Pernambuco, northeastern coast of Brazil. *Afr J Microbiol Res* 2016; 10(10): 312-8.
- Barbosa RCSBC, Giesbrecht AM, Barbosa-Filho JM, Yoshida M, Gottlieb OR. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. *Acta Amazônica* 1988; 8(1/2): 91-94. Suplemento.
- Barbosa-Filho JM, Yoshid M, Gottlieb OR, Barbosa RCSBC, Giesbrecht AM, Young MCM. Benzoyl esters and amides, stryrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry* 1987; 26(9): 2615-7.
- Becerra MC Guiñazú N, Hergert LY, Pellegrini A, Mazzieri MR, Gea S et al. *In vitro* activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and trypomastigote forms. *Exp Parasitol* 2012; 131(1): 57-62.
- Bunel V, Ouedraogo M, Nguyen AT, Stévigny C, Duez P. Methods applied to the *in vitro* primary toxicology testing of natural products: State of the art, strengths, and limits. *Planta Med* 2014; 80(14): 1210-26.
- Catão RMR, Barbosa-Filho JM, Gutierrez SJC, Lima EOL, Pereira MSV, Arruda TA et al. Evaluation of the antimicrobial activity about multiresistents samples of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Rev Bras Anál Clin* 2005; 37(4): 247-49.
- Catão RMR, Barbosa-Filho JM, Lima EOL, Pereira MSV, Silva MAR, Arruda TA et al. Evaluation of the antimicrobial activity and biological effect by riparins about elimination the resistance of drugs in samples of *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Anál Clín* 2005; 42(1): 9-14.
- Ciofu O, Olker-Nielsen T, Jensen PØ, Wang H, Høiby N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 85: 7-23.
- CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 27<sup>a</sup> ed. CLSI suplemento M100. Wayne PA: Clinical & Laboratory Standards Institute, 2017.
- Di Domenico EG, Farulla I, Prignano G, Gallo MT, Vespaziani M, Cavallo I et al. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. *Int J Mol Sci* 2017; 18(5): E1077.
- Eller SCWS, Feitosa VA, Arruda TA, Antunes RMP, Catão RMR. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2015; 36(1): 131-36.

Eriksson, S. van der Plas MJA, Mörgelin M, Sonesson A. Antibacterial and anti-biofilm effects of sodium hypochlorite against *Staphylococcus aureus* isolates derived from patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2017; 177(2): 513-21.

Ferreira SB, Palmeira JD, Souza JH, de Almeida JM; Figueiredo MCP, Pequeno AS et al. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Anál Clín* 2010; 42(1): 7-31.

Forzza RC, Leitman PM, Costa A, de Carvalho-Júnior AA, Peixoto AL, Walter BMT et al. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Org. Rafaela Campostrini Forzza et al: Andrea Jakobsson Estúdio/Jardim Botânico do Rio de Janeiro, vol. 1. 1699p. 2010.

Francescato LN, Deuschle RAN, Mallmann CA, Alves SH, Heinzmann BM. Antimicrobial activity of *Senecio heterotrichius* DC. *Rev Bras Ciênc Farm* 2007; 43(2): 239-45.

Kart D, Tavernier S, Van Acker H, Nelis HJ, Coenye T. Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* 2014; 30(3): 377-83.

Kaye KS, Gales AC, Dubourg G. Old antibiotics for multidrug-resistant pathogens: from *in vitro* activity to clinical outcomes. *Inter J Antimicrob Agents* 2017; 49(5): 542-8.

Jo HY, Kim Y, Park HW, Moon HE, Bae S, Kim JW et al. The Unreliability of MTT Assay in the cytotoxic test of primary cultured glioblastoma cells. *Exp Neurobiol* 2015; 24(3): 235-45.

Lai MJ, Lin NT, Hu A, Soo PC, Chen LK, Chen LH et al. Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage 6AB2 endolysin (LysAB2) against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 90(2): 529-39.

Marmitt DJ, Rempel C, Goettert MI, Silva AC. Medical plants with potential antifungal properties listed in the RENISUS inventory. *Rev Bras Pesq Saúde* 2015; 17(3): 151-62.

Melo CTV, Monteiro AP, Leite CP, de Araújo FL, Lima VT, Barbosa-Filho JM et al. Anxiolytic-like effects of (O-Methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (*Lauraceae*) in Mice. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(3): 451-4.

Monson BK, Stringham J, Jones BB, Abdel-Aziz S, Peck CMC, Olson RJ. Scanning electron microscopy visualization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after contact with gatifloxacin with and without preservative. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010; 26(2): 133-6.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.

Oliveira JF, Lima TS, Vendramini-Costa DB, de Lacerda Pedrosa SCB, Lafayette EA, da Silva RMF et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. *Eur J Med Chem* 2017; 136: 305-14.

Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(8): 2720-2.

Rybtke M, Hultqvist LD, Givskov M, Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. *J Mol Biol* 2015; 427(23): 3628-45.

Santajit S, Indrawattana I. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 2475067.

Sashidhara KV, Rao KB, Kushwaha P, Modukuri RK, Singh P, Soni I et al. Novel chalcone-thiazole hybrids as potent inhibitors of drug resistant *Staphylococcus aureus*. *J Am Chem Soc* 2015; 6(7): 809-13.

Scavuzzi AML, Alves LC, Veras DL, Brayner FA, Lopes ACS. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla<sub>KPC-2</sub> gene. *J Med Microbiol* 2016; 65(12): 1370-7.

Sharland M, Saroey P, Berezin EN. A ameaça global da resistência antimicrobiana – a necessidade de instrumentos de vigilância padronizados para definir carga e desenvolver intervenções. *J Pediatr* 2015; 91(5): 410-2.

Sharma P, Sharma JD. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol* 2001; 74(3): 239-43.

Silva LCN, Sandes JM, de Paiva MM, de Araújo JM, de Figueiredo RC, da Silva MV et al. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat Prod Res* 2013; 27(16): 1492-6.

Silva ALL, Araújo MGS, Bastos MLA, Bernardo THL, Oliveira JFS, Silva-Junior EF et al. Evaluation of antibacterial, cytotoxic, and antioxidant activity of the plant species *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill. *Rev Bras PI Med* 2016; 18(1 supl. 1): 307-15.

Siqueira VLD, Cardoso RF, Caleffi-Ferracioli KR, Scodro RBL, Fernandez MA, Fiorini A et al. structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(7): 3957–67.

Stepanović S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40(2): 175-9.

Teixeira CP, de Melo CT, de Araújo FL, de Carvalho AM, Silva MI, Barbosa-Filho JM et al. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *J Pharm Pharmacol* 2011; 27(2): 129-37.

Thomas G, Branco UJ, Barbosa Filho JM, Bachelet M, Vargaftig BB. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea pig alveolar leucocytes. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46(2): 103-7.

Veras DL, Lopes ACS, da Silva GV, Gonçalves GGA, de Freitas CF, de Lima FCG, Maciel MAV et al. Ultrastructural changes in clinical and microbiota isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of genes bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>TEM</sub>, bla<sub>CTX-M</sub> or bla<sub>KPC</sub> when subject to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Sci World J* 2015; 2015: 1-13.

Yamaguchi KKL, Veiga-Junior VF. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. *Quim Nova* 2013; 36(6): 826-30.

Zajmi A, Hashim NM, Noordin MI, Khalifa SAM, Ramli F, Ali HM et al. Ultrastructural study on the antibacterial activity of artonin e versus streptomycin against *Staphylococcus aureus* strains. *Plos One* 2015; 10(6): e0128157.

## Legendas para figuras

Fig. 1 Investigação da concentração citotóxica em células de linhagem Vero e percentual hemolítico em eritrócitos humanos de riparinas (I, II e III) e antimicrobianos disponíveis.

Fig. 2 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima da riparina III frente cepas padrão ATCC e isolados clínicos multidroga-resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* obtidos de dois hospitais públicos do Recife/PE.

Fig. 3 Valores das densidades óticas (DO) de biofilmes de isolados MDR de *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* expostos à riparina III. Para a análise de significância, foi utilizado ANOVA e pós-teste T de *Student*. Os valores \*\* diferem significativamente entre as condições experimentais ( $p < 0,05$ ).

Fig. 4 Eletromicrografia das alterações ultraestruturais induzidas pela ação da riparina III em isolados clínicos multidroga-resistentes de *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* por microscopia eletrônica de varredura.

Fig. 5 Caracterização e perfil de resistência a antimicrobianos de isolados clínicos multidroga-resistentes obtidos de dois hospitais públicos do Recife/PE.

Fig. 1

Composto	Citotoxicidade	
	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	% hemolítico
Riparina I	144,1±4,24	9,01±1,92
Riparina II	174,3±9,08	8,61±3,89
Riparina III	142,0±21,7	25,99±1,37
OXA	162,9±14,7	17,57±5,97
MPM	182,7±14,7	10,88±2,67

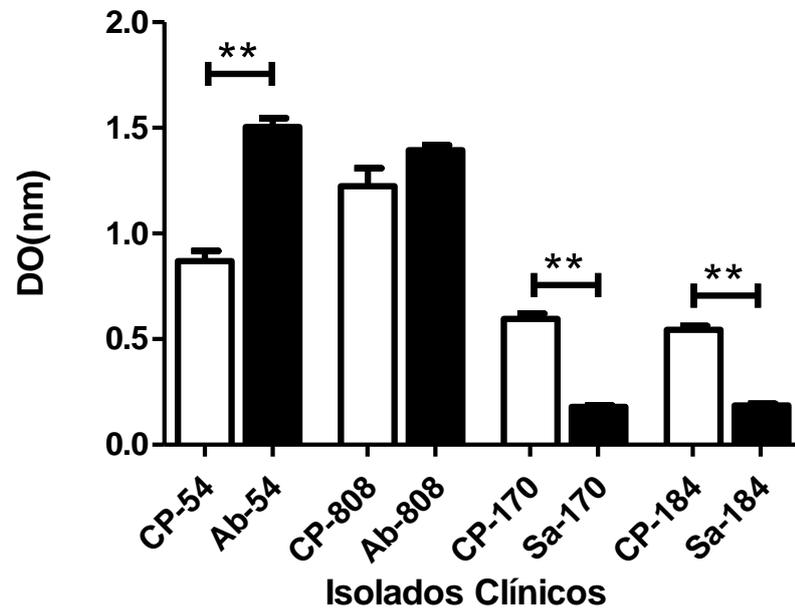
Legenda: CC<sub>50</sub>, Concentração citotóxica em 50% das células; OXA, Oxacilina; MPM, Meropenem.

Fig. 2

Riparina III					
<i>S. aureus</i>			<i>A. baumannii</i>		
Isolados	CIM	CBM	Isolados	CIM	CBM
<b>170</b>	50 µg/mL		<b>54</b>	400 µg/mL	
<b>184</b>	50 µg/mL		<b>113</b>	-	
<b>186</b>	50 µg/mL		<b>379</b>	400 µg/mL	
<b>382</b>	50 µg/mL		<b>570</b>	-	
<b>454</b>	50 µg/mL		<b>808</b>	400 µg/mL	
<b>ATCC</b>	50 µg/mL		<b>ATCC</b>	400 µg/mL	

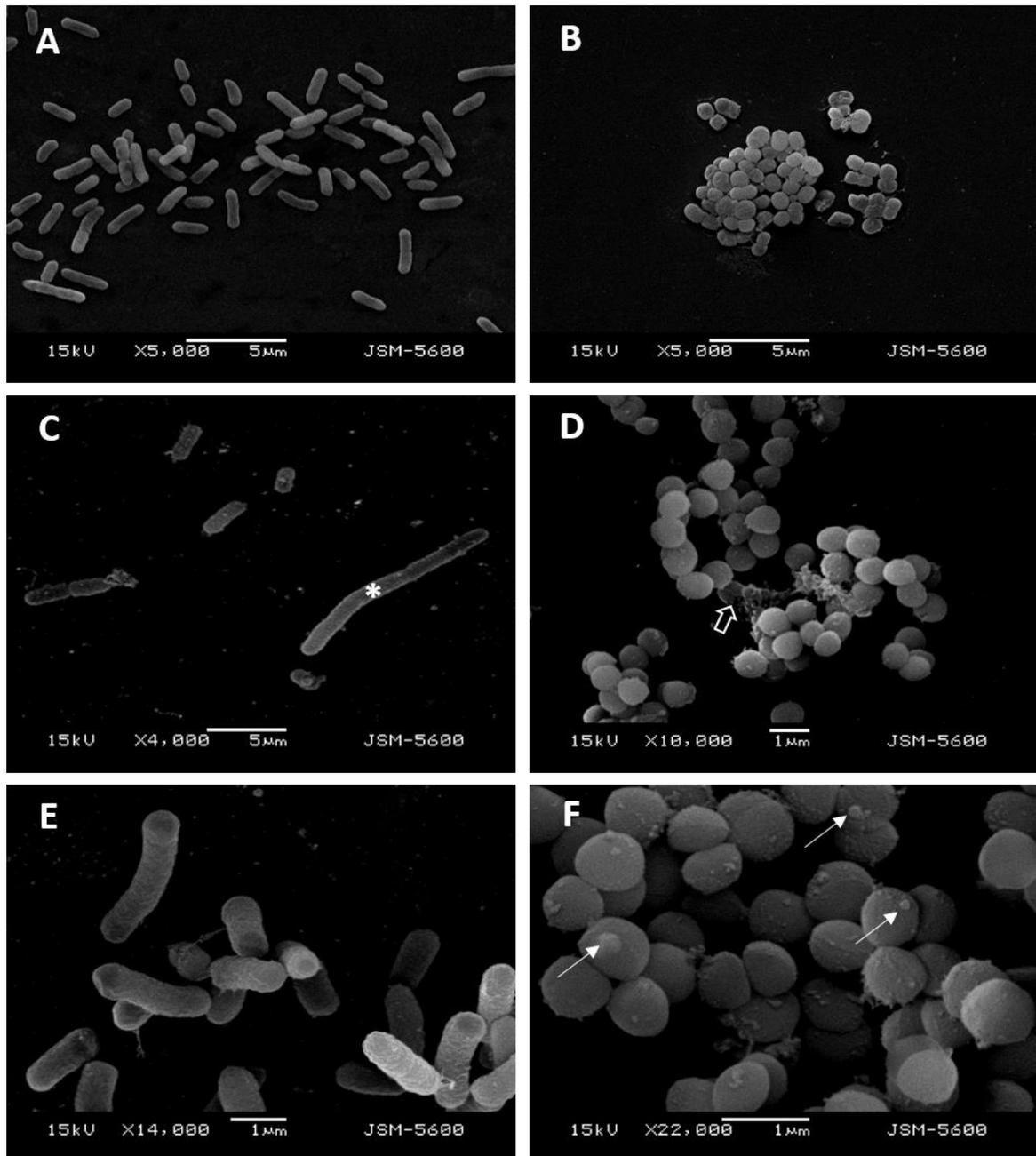
Legenda: -, sem atividade antimicrobiana; CIM, Concentração Inibitória Mínima; CBM, Concentração Bactericida Mínima.

Fig. 3



Legenda: DO(nm), densidade ótica (nanômetros); CP, controle positivo com ausência de riparina III; Ab, *Acinetobacter baumannii*; Sa, *Staphylococcus aureus*. \*\* ( $p < 0.05$ ).

Fig. 4



A. Células-controle de *A. baumannii* tratadas com DMSO; B. Células-controle de *S. aureus* tratadas com DMSO; C. *A. baumannii* após exposição à riparina III ( $200\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por 18h - asterisco indica alongamento celular e ausência de formação do septo, sendo verificada redução do número de células bacterianas; D. *S. aureus* após exposição à riparina III ( $25\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por 18h - seta indica extravasamento citoplasmático devido à ruptura celular, além de células com morfologias indefinidas; E. *A. baumannii* submetido à riparina III ( $200\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por 18h - são observadas diversas células bacterianas com aspecto rugoso acentuado na parede celular e morfologia indefinida; F. *S. aureus* tratado com riparina III ( $25\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por 18h - setas demonstram desfragmentação na superfície celular e protuberâncias, além de aspecto rugoso e morfologia incomum à espécie.

Fig. 5

ESPÉCIES BACTERIANAS	ISOLADOS	AMOSTRAS BIOLÓGICAS	HOSPITAIS	SETORES	RESISTÊNCIA
<i>A. baumannii</i>	54	Ponta de cateter	A	UTI	AMI, AMP, CAZ, CIP, COL, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM
<i>A. baumannii</i>	113	Lesão Pé Direito	B	ENF	CAZ, CIP, CPM, CTX, IPM, MPM, PPT
<i>A. baumannii</i>	379	Líquor/Abdome	A	UTI	AMI, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN, IPM, MPM
<i>A. baumannii</i>	570	Hemocultura	A	UTI	AMP, CAZ, CFX, CFX/A, CIP, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM
<i>A. baumannii</i>	808	Líquor	B	UTI	AMP, CAZ, CIP, CPM, CRO, CRX, CRX/A, GEN, IPM, MPM
<i>S. aureus</i>	170	Hemocultura	A	ENF	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	184	Secreção Fístula Perna Esquerda	B	AMB	CIP, CLI, ERI, GEN, MOX, NOR, OXA, PEN, RIF, TRI
<i>S. aureus</i>	186	Fragmento de osso	A	ENF	CIP, CLI, ERI, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	382	Ponta de cateter	B	ENF	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	454	Ferida operatória	B	ENF	CIP, CLI, ERI, MOR, NOR, OXA
<i>K. pneumoniae</i>	94	Sangue	A	ENF	AMC, AMP, CAZ, CIP, CPM, CTN, CTX, ERT, LEV, PPT, TMP-SMX,
<i>K. pneumoniae</i>	265	Urina	A	UTI	AMI, AMP, ASB, CAZ, CIP, CPM, CRO, CRX/A, CTX, ERT, GEN, IMP, MER
<i>K. pneumoniae</i>	483	Swab nasal	B	ENF	AMP, ASB, AZT, CAZ, CIP, CPM, CTN, CTX, ERT, IMP, PPT
<i>K. pneumoniae</i>	652	Swab retal	B	ENF	AMP, ASB, AZT, CAZ, CPM, CTN, CTX, CRO, ERT, GEN, IMP, MPM, PPT

<i>K. pneumoniae</i>	952	Swab nasal	B	UTI	AMP, ASB, AZT, CFO, CTN, CPM, CRO, CTX, CIP, ERT, GEN, IMP, PPT
<i>P. aeruginosa</i>	14	Secreção traqueobrônquica	A	UTI	AMI, CAZ, CIP, CRO, GEN, IPM, MPM,
<i>P. aeruginosa</i>	23	Secreção do braço	A	ENF	AMI, AZT, CAZ, CIP, CTX, GEN, IPM, MPM, PPT
<i>P. aeruginosa</i>	575	Urina	B	ENF	AMI, AZT, CAZ, CIP, CTX, GEN, IPM, MPM, PPT
<i>P. aeruginosa</i>	611	Fragmento ósseo	A	ENF	CAZ, CIP, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM
<i>P. aeruginosa</i>	682	Urina	A	ENF	AMI, CAZ, CIP, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM

**Legenda:** A, hospital 1; B, hospital 2; AMB, Ambulatório; ENF, Enfermaria; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; AMI, Amicacina; AMP, Ampicilina; AZT, Aztreonam; ASB, Ampicilina/Sulbactam; CAZ, Ceftazidima; CIP, Ciprofloxacina; COL, Colistina; CPM, Cefepime; CRO, Ceftriaxona; CRX, Cefuroxima; CRX/A, Cefuroxima/Axetil; CTN, Cefalotina; CTX, Cefotaxima; GEN, Gentamicina; IPM, Imipenem; MPM, Meropenem; PEN, Benzilpenicilina; PPT, Piperacilina/Tazobactam; TMP-SMX, Trimetropim/Sulfametoxazol.

## 6 CONCLUSÕES

A concentração citotóxica das riparinas naturais I, II e III em células Vero apresentou bastante similaridade aos antimicrobianos testados (oxacilina e meropenem), bem como exibiram baixo percentual hemolítico em eritrócitos humanos comparados aos antimicrobianos avaliados. Foi possível determinar a atividade antimicrobiana da riparina III frente cepas padrão ATCC e isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*.

A riparina III ainda apresentou uma significativa atividade antibiofilme em isolados clínicos MDR de *S. aureus*, bem como modificações ultraestruturais induzidas *in vitro* em isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*.

Dessa forma, percebe-se a necessidade de incentivar estudos de compostos naturais, quanto à atividade antimicrobiana e antibiofilme, face a frequente disseminação resistência bacteriana, o que determina a diminuição de opções terapêuticas para tratamento de IRAS. Logo, a riparina III pode ser considerada um composto natural promissor diante das características antimicrobianas apresentadas frente isolados clínicos MDR e formadores de biofilme de *S. aureus* e *A. baumannii*, promovendo subsídios para análises do desenvolvimento de novas opções terapêuticas de IRAS.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, S. et al. Emergence of carbapenem resistant non-fermenting Gram-negative bacilli isolated in an ICU of a tertiary care hospital. **J Clin Diagn Res**, v. 11, n. 1, p. DC04-DC07, 2017.

ALMEIDA, N. R. et al. Perfil epidemiológico das infecções relacionadas à assistência à saúde em Unidades de Terapia Intensiva – Revisão Integrativa. **Cadernos USP**, v. 9, n. 1, p. 42-51, 2015.

ALVES, R. C. C. et al. Antimicrobial activity of seaweeds of Pernambuco, northeastern coast of Brazil. **Afr J Microbiol Res**, v. 10, n. 10, p. 312-318, 2016.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. Brasília: ANVISA; 2013a. Disponível em: <<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/category/manuais>>. Acesso em: 29/03/2016.

\_\_\_\_\_. Nota Técnica nº 1/2013. **Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes**. Brasília: ANVISA; 2013b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e45096b9f5a2ec>>. Acesso em: 29/03/2016.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2615-2617, 1987.

BARBOSA, R. C. S. B. C. et al. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amazônica**, v. 8, n. 1/2, p. 91-94, 1988. Suplemento.

BARTH JUNIOR, V. C. **Avaliação da formação de células persistentes em *Acinetobacter baumannii***. 2014. 41f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Faculdade de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2014.

BECERRA, M. C. et al. *In vitro* activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and trypomastigote forms. **Exp Parasitol**, v. 131, n. 1, p. 57-62, 2012.

BENCY, J. A. T.; PRIYANKA, R.; JOSE, P. A study on the bacteriological profile of urinary tract infection in adults and their antibiotic sensitivity pattern in a tertiary care hospital in central Kerala, India. **Int J Res Med Sci**, v. 5, n. 2, p. 666-669, 2017.

BESSA, C. M. A. S. et al. Syagrus coronata seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Med Plants Res**, v. 10, n. 23, p. 310-317, 2016.

BEZERRA, D. P. et al. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **Eur J Pharm Sci**, v. 48, n. 3, p. 453-463, 2013.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS**, v. 121(suppl.136), p. 1-54, 2013.

BLEIZIFFER, I. et al. Plasmin-sensitive protein pls in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a glycoprotein. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 1, p. e1006110, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde**. Brasília: 2006a. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf>>. Acesso em: 28/12/2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: 2006b. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf)>. Acesso em: 28/07/2017.

BRANDA, S. S. et al. Biofilms: the matrix revisited. **Trends Microbiol**, v. 13, p. 20-26, 2005.

BUSH, K. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 12, p. 894–896, 2014.

CAMILO, C. J.; PEDER, L. D.; SILVA, C. M. Prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente em profissionais de enfermagem. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 9, n. 2, p. 361-371, 2016.

CANZI, K. R.; COLACITE, J. Frequência de pneumonia associada à ventilação mecânica com base em resultados de culturas quantitativas de secreções traqueais. **RBAC**, v. 48, n. 2, p. 118-122, 2016.

CARVALHO, L. I. S. **Síntese e avaliação de derivados benzoxazólicos do eugenol como potenciais agentes antifúngicos**. 2015. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais. Alfenas. 2015.

CARVALHO, M. M. et al. Infecções hospitalares nas unidades de terapia intensiva em um hospital público. **Rev Interdisci NOVAFAPI**, Teresina, v. 4, n. 4, p. 42-48, 2011.

CARVALHO, M. R. et al. Incidência de bactérias multirresistentes em uma unidade de terapia intensiva. **Rev Interd**, v. 8, n. 2, p. 75-85, 2015.

CASTELO-BRANCO, U. V. **Preparação e estudos farmacológicos do éter metílico de N-benzoiltiramina e do éter metílico de N-(2-**

**hidroxibenzoil)tiramina**. 1992. Dissertação. (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 1992.

CASTELO-BRANCO, U. V. et al. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Nees) Mez (*Lauraceae*). **Acta Farm Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 197-202, 2000.

CASTELO-BRANCO, U. J. V. et al. Atividade espasmolítica de benzamidas isoladas de *Aniba riparia* (parte 1). Resumo VI Annual Meeting of the Federation of the Societies of Experimental Biology, FESBE, Brazil. Abstr. v. 6, n. 69, p. 302, 1991.

CATÃO, R. M. R. et al. Evaluation of the antimicrobial activity about multiresistents samples of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Rev Bras Análises Clín**, v. 37, n. 4, p. 247-249, 2005.

CATÃO, R. M. R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras Análises Clin**, v. 42, n. 1, p. 09-14, 2010.

CATÃO, R. M. R. et al. Atividade antibacteriana e efeito interativo in vitro de um produto a base de cranberry sobre *Escherichia coli*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 35, n. 4, p. 723-729, 2014.

CAVALCANTI, C. L. B. **Tipagem molecular de genes de resistência e virulência associado à expressão gênica em isolados de *Acinetobacter baumannii* submetidos a antimicrobianos**. 2017. 109f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2017.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Healthcare-associated Infections (HAI) Progress Report**, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hai/surveillance/progress-report/>>. Acesso em: 20/12/2016.

CECIH, Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar. **Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde e resistência microbiana do estado de Pernambuco – primeiro semestre de 2016.**

Disponível em: [http://www20.anvisa.gov.br/segurancado/paciente/images/documentos/boletins/Boletim\\_Apevisa\\_versao\\_final.pdf](http://www20.anvisa.gov.br/segurancado/paciente/images/documentos/boletins/Boletim_Apevisa_versao_final.pdf). Acesso em: 20/12/2016.

CHAN, B. C. et al. Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against Nor A over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. **J Ethnopharmacol**, v. 137, p. 767-773, 2011.

CHAN, B. K. et al. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. **Sci Rep**, v. 6, n. 26717, 2016.

CHOU, D. W. et al. Septic pulmonary embolism requiring critical care: clinicoradiological spectrum, causative pathogens and outcomes. **Clinics**, v. 71, n. 10, p. 562-569, 2016.

CIOFU, O. et al. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 85, p. 7-23, 2015.

CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 27<sup>a</sup> ed. CLSI suplemento M100. Wayne PA: Clinical & Laboratory Standards Institute, 2017.

COELHO, I. C. et al. Avaliação da suscetibilidade da *Klebsiella pneumoniae* aos beta-lactâmicos. **Rev Epidemiol Control Infect**, v. 5, n. 2, p. 79-83, 2015.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **Int J Antimicrob Agents**, v. 11, n. 3-4, p. 217-21/237-9, 1999.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CRESS, B. F. et al. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. **FEMS Microbiol Rev**, v. 38, n. 4, p. 660-697, 2014.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60p.

DE SÁ CAVALCANTI, F. L. et al. High frequency of OXA-253-producing *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Recife, Brazil: a new threat? **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 1, 2017.

DETTORI, M. et al. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit. **New Microbiol**, v. 37, n. 2, p. 185-191, 2014.

DHIMAN, M. et al. Emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from north India harboring a novel *sasX* gene: further analyzing its role in biofilm formation. **Ann Med Biomed Sci**, v. 3, n. 1, p. 46-50, 2017.

DJORDJEVIC, Z. M.; FOLIC, M. M.; JANKOVIC, S. M. Distribution and antibiotic susceptibility of pathogens isolated from adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia in intensive care unit. **J Infect Public Health**, pii: S1876-0341(17)30028-X, 2017.

DUBEY, D. et al. Antimicrobial activity of medicinal plants used by aborigines of Kalahandi, Orissa, India against multidrug resistant bacteria. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 2, p. S846-S854, 2012.

EL FERTAS-AISSANI, R.; MESSAI, Y.; ALOUACHE, S.; BAKOUR, R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathol. Biol**, v. 61, n. 5, p. 209-16, 2013.

ELLER, S. C. W. S. et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 36, n. 1, p. 131-136, 2015.

ESTEBAN-CANTOS, A. et al. The population of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* is distinct and more clonal than the carbapenem-susceptible population. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 8, p. AAC.02520-16, 2017.

ERGUL, A. B. et al. Evaluation of microorganisms causing ventilator-associated Pneumonia in a Pediatric Intensive Care Unit. **Eurasian J Med**, v. 49, p. 87-91, 2017.

ERIKSSON, S. et al. Antibacterial and anti-biofilm effects of sodium hypochlorite against *Staphylococcus aureus* isolates derived from patients with atopic dermatitis. **Br J Dermatol**, v. 177, n. 2, p. 513-521, 2017.

EVANGELISTA, S. S.; OLIVEIRA, A. C. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido na comunidade: um problema mundial. **Rev Bras Enferm**, v. 68, n. 1, p. 136-143, 2015.

FERREIRA, E. G. et al. Prevalence of ventilator-associated pneumonia through analysis of tracheobronchial secretions. **Rev Rene**, v. 18, n. 1, p. 114-120, 2017.

FERREIRA, H. et al. Susceptibilidade de amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* a antibióticos e a clorexidina. **Rev Epidemiol Control Infect**, v. 4, n. 4, p. 243-248, 2014.

FERREIRA, J. S. et al. Food handler-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in public hospitals in Salvador. **Brazil Food Control**, v. 37, p. 395-400, 2015.

FERREIRA, S. B. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados

ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras Anál Clín**, v. 42, n. 1, p. 7-31, 2010.

FLOR, A. S. S. O.; BARBOSA, W. L. R. Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá - PA. **Rev Bras PI Med**, v. 17, n. 4 (supl. I): 757-768, 2015.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio/Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 2. 1699p. 2010.

FREITAS, C. F. **Determinação da presença de genes de resistência e virulência e da capacidade de formação de biofilme por isolados de *Klebsiella pneumoniae* multidroga-resistentes submetidos a antibióticos**. 2014. 121f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical). Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2014.

GLUPCZYNSKI, Y. et al. Distribution and prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolates in Intensive Care Units (ICU) in Belgian hospitals between 1996 and 1999. **Acta Clin Belg**, v. 56, p. 297-306, 2001.

GRIMSTONE, A. V. O microscópio eletrônico em Biologia. Ed. Pedagógica e Universidade Ltda; Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, 1980.

GOLKAR, Z.; BAGASRA, O.; PACE, D. G. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 2, p. 129-136, 2014.

GOULART, M. E. A. et al. *Staphylococcus aureus* isolado de swab nasal em um hospital militar. **Rev Saúde**, v. 4, n. 1, p. 05-09, 2015.

GROSS, M. Antibiotics in crisis. **Curr Biol**, v. 23, 24, p. R1063-R1065, 2013.

HØIBY, N. et al. Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. **APMIS**, v. 125, n. 4, p. 339-343, 2017.

HEARN, P. et al. Prospective surveillance of healthcare associated infections in a Cambodian pediatric hospital. **Antimicrob Resist Infect Control**, v. 6, p. 16, 2017.

HEGGENDORNN, L. H. et al. Epidemiological profile and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from nosocomial infections. **Rev Saúde e Meio Ambiente - RESMA**, v. 2, n.1, p. 26-47, 2016.

HONG, D. J. et al. Epidemiology and characteristics of metallo- $\beta$ Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Chemother**, v. 47, n. 2, p. 81-97, 2015.

JOSHI, H. A.; SHAH, S. S. A study on bacteriological profile, drug sensitivity and resistance pattern of isolated organism in neonatal septicaemia in neonatal intensive care unit. **Int J Contemporary Pediatrics**, v. 4, n. 4, p. 1430-1433, 2017.

KANODIA, P. et al. Bacteriological profile of blood culture positive sepsis in newborn at BPKIHS, Dharan, Nepal. **J Colleg Med Sciences/Nepal**, v 13, n.1, 2017.

KART, D. et al. Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofouling**, v. 30, n. 3, p. 377-783, 2014.

KAYE, K. S.; GALES, A. C.; DUBOURG, G. Old antibiotics for multidrug-resistant pathogens: from in vitro activity to clinical outcomes. **Inter J Antimicrob Agents**, v. 49, n. 5, p. 542-548, 2017.

KHAN, U. A. *Alkanna tinctoria* leaves extracts: a prospective remedy against multidrug resistant human pathogenic bacteria. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 127, 2015.

KHAN, R. et al. Antibacterial activities of *Rhazya stricta* leaf extracts against multidrug-resistant human pathogens. **Biotechnol Biotechnol Equip**, v. 30, p. 1016-1025, 2016.

KHOSRAVI, A D. et al. Genotyping of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn and wound infections by ERIC-PCR. **Acta Cir Bras**, v. 31, n. 3, p. 206-211, 2016.

KIRMUSAOĞLU, S. et al. The effect of urinary catheters on microbial biofilms and catheter associated Urinary Tract Infections. **Miscellaneous**, v. 14, n. 2, p. 3028-3034, 2017.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 1, 1984.

LEANDRO, L. F. et al. Antibacterial activity of *Pinus elliottii* and its major compound, dehydroabiatic acid, against multidrug-resistant strains. **J Med Microbiol**, v. 63, p. 1649-1653, 2014.

LEE, Y. W. et al. Complete genome of the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain KBN10P02143 isolated from Korea. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 355-358, 2016.

LIMA, A. M. S. et al. Investigation of class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* clinical and microbiota isolates belonging to different phylogenetic groups in Recife, State of Pernambuco. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 2, p. 165-169, 2014.

LIMA, F. C. G. **Análise da ação do meropenem e Polimixina E com a IgG humana frente isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de infecções relacionadas à assistência à saúde**. 2015. 85f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical). Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2015.

LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares - revisão de literatura. **Rev UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, p. 32-39, 2015.

LOPES, A. C. S. et al. Occurrence and analysis of *irp2* virulence gene in isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. from microbiota and hospital and community-acquired infections. **Microb Pathog**, v. 96, p. 15-19, 2016.

LOUREIRO, R. J. et al. E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Rev Port Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MARMITT, D. J. et al. Medical plants with potential antifungal properties listed in the RENISUS inventory. **Rev Bras Pesq Saúde**, Vitória, v. 17, n. 3, p. 151-162, 2015.

MANGUEIRA, E. V. C. **Avaliação da presença e expressão de genes de virulência e mecA em isolados de *Staphylococcus* spp submetidos à oxacilina e tigeciclina.** 2016. 153f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2016.

MATOS-ROCHA, T. J. et al. Ultrastructural changes in *Schistosoma mansoni* male worms after *in vitro* incubation with the essential oil of *Mentha x villosa* huds. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 58, p. 4, 2016.

MATOS-ROCHA, T. J. et al. Ultrastructural study of morphological changes in *Schistosoma mansoni* after *in vitro* exposure to the monoterpene rotundifolone. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 86-91, 2017.

MELO, C. T. V. et al. Anxiolytic-Like effects of (O-Methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (*Lauraceae*) in mice. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 3, p. 451-454, 2006

MOHMMED, S. A. et al. Confocal laser scanning, scanning electron, and transmission electron microscopy investigation of *Enterococcus faecalis* biofilm

degradation using passive and active sodium hypochlorite irrigation within a simulated root canal model. **Microbiologyopen**, v. 6, n. 4, 2017.

MOHAMMED, R. S. et al. Flavonoid constituents, cytotoxic and antioxidant activities of *Gleditsia triacanthos* L. leaves. **Saudi J Biol Sci**, v. 21, n. 6, p. 547-553, 2014.

MOON, K. H.; WEBERA, B. S.; FELDMAN, M. F. Subinhibitory concentrations of trimethoprim and sulfamethoxazole prevent biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* through Inhibition of csu pilus expression. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 9e00778-17, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, Dec 16, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NEBES, F. B. et al. Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* na fibrose cística e caracterização de cepas mucóides. **Cad Esc Saúde**, Curitiba, v. 1, n. 15, p. 96-109, 2016.

NORCIA, B. M. M. et al. Pacientes pediátricos portadores de enterobactéria resistente aos carbapenêmicos em um hospital escola do Sul do Brasil. **J Infect Control**, v. 4, n. 1, p. 11-15, 2015.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. B. et al. Multiple healthcare-associated infections in a patient with Crohn's disease: Case report. **Rev Epidemiol Control Infec**, Santa Cruz do Sul, v. 6, n. 2, p. 104-106, 2016.

OLIVEIRA, J. F. et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **Eur J Med Chem**, v. 136, p. 305-314, 2017.

OLIVEIRA, P. R. et al. Infecção de sítio cirúrgico após fixação de fraturas fechadas e expostas – incidência e perfil microbiológico. **Rev Bras Ortop**, v. 51, n. 4, p. 396-399, 2016.

OSTRIA-HERNANDEZ, M. L. et al. Nosocomial, multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from Mexico City produce robust biofilms on abiotic surfaces but not on human lung cells. **Microb Drug Resist**, 2017.

OTTO, C. C. et al. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 9, p. 26, 2010.

PALOMINO, J. C. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PANDAY, J. B.; POUDEL, A.; HIRACHAND S. Extended spectrum beta-lactamase producers among the multidrug-resistant uropathogens. **Int J Biol Med Res**, v. 7, n. 1, p. 5362-5366, 2016.

PAZ, M. C. F.; FORTES, D. I. F. M.; SILVA, D. H. G. Análise da infecção hospitalar em um hospital universitário na Paraíba no período de 2012 a 2014. **Rev Saúde e Ciênc Online**, v. 4, n. 3, p. 31-43, 2015.

PEREIRA, F. G. F. et al. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Vigil Sanit Debate**, v. 4, n. 1, p. 70-77, 2016a.

PEREIRA, J. N. P. et al. Phenotypic and molecular characterization of resistance to macrolides, lincosamides and type B streptogramin of clinical isolates *Staphylococcus* spp. of a university hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 20, n. 3, p. 276-281, 2016b.

PEREIRA, M. O. B. O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (Carbamato e Glutaraldeído) em sistemas de biofilmes**. 2001. 234f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica). Universidade do Minho/Braga. 2001.

PERNA, T. D. G. S. et al. Prevalência de infecção hospitalar pela bactéria do gênero *Klebsiella* em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Rev Soc Bras Clin Med**, v. 13, n. 2, 119-123, 2015.

RADJASA, O. K. et al. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: their biomedical potential and possible production by microbial associates. **Bioorg Med Chem**, v. 19, n. 22, p. 6658-6674, 2011.

RAHMAN, A. K. M. S. et al. Antibacterial activity of two limonoids from *Swietenia mahagoni* against multiple-drugresistant (MDR) bacterial strains. **J Nat Med**, v. 63, p. 41-45, 2009.

RAJASEKHARAN, S. K.; RAMESH, S.; SATISH, A. S.; LEE J. Antibiofilm and anti- $\beta$ -Lactamase activities of burdock root extract and chlorogenic acid against *Klebsiella pneumoniae*. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 27, n. 3, p. 542–51, 2017.

RAMIREZ-BLANCO, C. E. et al. Infection in burn patients in a referral center in Colombia. **Burns**, v. 43, n. 3, p. 642–653, 2017.

RENNER, L. D. et al. Detection of ESKAPE bacterial pathogens at the point of care using isothermal DNA-based assays in a portable degas-actuated microfluidic diagnostic assay platform. **Appl Environ Microbiol**, v. 83, n. 4, p. e02449-16, 2017.

REIS, A. C. C. et al. Ciprofloxacin resistance pattern among bacteria isolated from patients with community-acquired urinary tract infection. **Rev Inst Med Trop**, v. 58, n. 53, 2016.

ROBERTS, P. J. et al. Characteristics of 32 *Acinetobacter baumannii* isolates co-harboring OXA-carbapenemases and 16S rRNA methylase gene. **Afr J Microbiol Res**, v. 11, n. 4, p. 110-116, 2017.

ROCHA, I. V. et al. Resistência de bactérias isoladas em equipamentos em unidade de terapia intensiva. **Acta Paul Enferm**, v. 28, n. 5, p. 433-439, 2015.

ROCHA-PEREIRA, N.; LAFFERTY, N.; NATHWANI, D. Educating healthcare professionals in antimicrobial stewardship: can online-learning solutions help? **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 12, p. 3175-3177, 2015.

ROCK, C. et al. Resolution of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a tertiary cancer center; the role of active surveillance. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 38, n. 9, p. 1117-9, 2017.

RODRIGUES, A. N. et al. Impactos e fatores determinantes no *bundle* de pneumonia associada à ventilação mecânica. **Rev Bras Enferm [Internet]**, v. 69, n. 6, p. 1045-1051, 2016.

RODRIGUES, C. N.; PEREIRA, D. C. A. Infecções relacionadas à assistência à saúde ocorridas em uma unidade de terapia intensiva. **Rev Investig Bioméd**, v. 8, p. 37-47, 2016.

ROHWER, J. G. Em *The Families and Genera of Vascular Plants*; Kubitzki, K.; Rohwer, J. G.; Bittrich, V., eds.; Springer-Verlag: Berlin, 1993, p. 336; Gottlieb, O. R.; **Phytochemistry**, v. 11, p. 1537, 1972.

ROMÃO, A. R. et al. *Staphylococcus aureus* bacteremia in a Brazilian Midwest teaching hospital. **Rev Patol Trop**, v. 45, n. 4, p. 412-416, 2016

RYBTKE, M., et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. **J Mol Biol**, v. 427, n. 23, p. 3628-3645, 2015.

SADER, H. S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility results from four years (2012-2015) of the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) Program in the United States. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, p. 3-7 e02252-16. 2017.

SALA, L. G. P. et al. Main pathogens involved in the cases of sepsis in burned patients: a review on the literature. **Rev Bras Queimaduras**, v. 15, n. 3, p. 164-8, 2016.

SALES, V. M. et al. Análise microbiológica de superfícies inanimadas de uma Unidade de Terapia Intensiva e a segurança do paciente. **R Enferm Referência**. Série IV, n. 3, p. 45-53, 2014.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, I. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Biomed Res Int**, 2016: 2475067, p. 1-8, 2016.

SANTIAGO, R. F. et al. Riparin B, a synthetic compound analogue of Riparin, inhibits the systemic inflammatory response and oxidative stress in mice. **Inflammation**, v. 38, n. 6, p. 2203-2215, 2015.

SANTOS, W. B. et al. Microbiota infectante de feridas cirúrgicas: análise da produção científica nacional e internacional. **Rev Sobecc São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 46-51, 2016a.

SANTOS, A. K. S. et al. Microbiological profile of nosocomial infections at intensive care units. **Rev Enferm UFPE on line**, v. 10(Supl. 3), p. 1432-1440, 2016b.

SEIBERT, G. et al. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. **Einstein**, v. 12, n. 3, p. 282-286, 2014.

SHARLAND, M.; SAROEY, P.; BEREZIN, E. N. A ameaça global da resistência antimicrobiana – a necessidade de instrumentos de vigilância padronizados para definir carga e desenvolver intervenções. **J Pediatr**, v. 91, n. 5, p. 410-412, 2015.

SHARMA, H. S. et al. Bacteriological profile of burn patients and antimicrobial susceptibility pattern of burn wound isolates. **Int Surg J**, v. 4, n. 3, p. 1019-1023, 2017.

SILVA, C. V. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste brasileiro. **Braz J Pharmacogn**, v. 20, n. 3, p. 355-60. 2010.

SILVA, L. C. N. et al. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Nat Prod Res**, p. 1-5, iFirst, 2012.

SILVA, R. O. et al. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chem Biol Interact**, v. 229, p. 55–63. 2015.

SILVA, S. T. **Análise fenotípica e genética de fatores virulência de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga-sensível e multidroga-resistente de Recife - PE.** 2016. 70f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical). Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2016.

SIQUEIRA, V. L. D. et al. Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 7, p. 3957-3967, 2014.

SOUSA, D. M. et al. Infecção por *Staphylococcus aureus* resistente em unidades de terapia intensiva: revisão integrativa. **Rev Enferm UFPE on line**, v. 10, n. 4, p. 1315-1323, 2016.

SOUSA, F. C. F. et al. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (*Lauraceae*) in mice. **Phytother Res**, v. 19, p. 1005-1008, 2005.

SOUSA F. C. F. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 28, n. 1, p. 95-103, 2014.

SOUSA F.C.F. et al. Evaluation of effects of N-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in anxiety models in mice. **Biol Pharm. Bull**, v. 30, p. 1212–1216, 2007.

SOUSA, M. A. S. et al. Prevalência de infecção da corrente sanguínea em idosos internados em um Hospital Geral. **Rev Pre Infec e Saúde**, v. 1, n. 3, p. 11-17, 2015.

SOUZA, G. A. A. D. et al. Perfil microbiológico de infecções de pele e partes moles em pacientes internos de um hospital universitário. **Rev Epidemiol Control Infec**, v. 6, n. 1, p. 33-36, 2016a.

SOUZA, S. C. S. et al. Fatores associados à mortalidade de pacientes com enterobactéria resistente aos carbapenêmicos. **Medicina** (Ribeirão Preto), v. 49, n. 2, p. 109-115, 2016b.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

SUBRAMANI, R.; NARAYANASAMY, M.; FEUSSNER, K. D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. **3 Biotech**, v. 7, n. 3, p. 172. 2017.

TAJEDDIN, E. et al. The role of the intensive care unit environment and healthcare workers in the transmission of bacteria associated with hospital acquired infections. **J Infect Public Health**, v. 9, n. 1, p. 13-23, 2016.

TAN, J. H. et al. In vitro and in vivo efficacy of an LpxC inhibitor, CHIR090, alone or combined with colistin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 7, p. e02223-16, 2017

TANG, C. et al. Epidemiology and outcomes of bloodstream infections in 177 severe burn patients from an industrial disaster: a multicenter retrospective study. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, pii: S1198-743X(17)30328-2, 2017.

TEIXEIRA, C. P. L. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **J Pharm Pharmacol**, v. 27, n. 2, p. 129-137, 2011.

THOMAS, G. et al. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea pig alveolar leucocytes. **J Pharm Pharmacol**, v. 46, p. 103-107, 1994.

VANEGAS, J. M.; PARRA, O. L.; JIMÉNEZ, J. N. Molecular epidemiology of carbapenem resistant gram-negative bacilli from infected pediatric population in tertiary care hospitals in Medellín, Colombia: an increasing problem. **BMC Infectious Diseases**, v. 1, n. 6, p. 463, 2016.

VASCONCELOS, A. S. et al. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 29, p. 394-403, 2015.

VERAS, D. L. et al. Ultrastructural changes in clinical and microbiota isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* or *bla<sub>KPC</sub>* when subject to  $\beta$ -lactam antibiotics. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-13, 2015.

VIEIRA, P. B.; PICOLI, S. U. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Rev Bras Ciênc Saúde**, v. 19, n. 2, p. 151-156, 2015.

VIEIRA, P. B. et al. Caatinga plants: Natural and semi-synthetic compounds potentially active against *Trichomonas vaginalis*. **Bioorganic Med Chem Lett**, 1, v. 26, n. 9, p. 2229-2236, 2016.

VUOTTO, C. et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **J Appl Microbiol**, v. 123, n. 4, p. 1003-1018, 2017a.

VUOTTO, C. et al. Biofilm-forming ability and clonality in *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urine samples and urinary catheters in different European hospitals. **Adv Exp Med Biol**, 2017b.

WHO, World Health Organization. **List of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. Geneva: WHO; 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>>. Acesso em: 14/07/2017.

WHO. World Health Organization. **Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance**. Geneva: WHO; 2015. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/163468/1/9789241564946\\_eng.pdf?ua=1&a=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/163468/1/9789241564946_eng.pdf?ua=1&a=1)>. Acesso em: 17/08/2017.

WHO. World Health Organization. **Regulatory situation of herbal medicines. A Worldwide Review**, Geneva: WHO, 1998, 45 p. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/whozip57e/whozip57e.pdf>>. Acesso em: 17/05/2017.

ZILBERBERG, M. D. et al. Multidrug-resistance, inappropriate empiric therapy, and hospital mortality in *Acinetobacter baumannii* pneumonia and sepsis. **Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 221. 2016.

## APÊNDICE A

### Article submitted to *Planta Médica*.

**Title:** Antimicrobial and antibiofilm activity of riparins (I, II and III) and ultrastructural changes in multidrug-resistant bacterial isolates of species of medical importance.

### Introduction

Natural compounds of plant origin are usually used by alternative medicine in the treatment of infections [ELLER et al., 2015]. It is estimated 500,000 plant species in worldwide, while 20% are found in Brazil [FORZZA et al 2010]. As a result of its use in popular therapy, the compounds acquired notoriety producing drugs from extracts and synthesis of precursor molecules [ELLER et al., 2015; MARMITT et al., 2015]. Chemical properties of plant compounds contribute to the performance of their biological activities, including antibacterial and antifungal [MARMITT et al., 2015; ALVES et al., 2016], making it essential to analyze the antimicrobial action of plant compounds, due to the decrease of treatment options of infections.

Healthcare-associated infections (HAI's) remain as a worldwide concern, mainly in the identification of multidrug-resistant (MDR) bacterial species to available antimicrobials, including *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; RENNER et al., 2017), besides to their ability to form biofilm, leading to persistent and recurrent infections (DI DOMENICO et al., 2017). This becomes an aggravating factor in therapeutic, due to the indiscriminate use of broad-spectrum antimicrobials and bacterial selective pressure [SHARLAND; SAROEY; BEREZIN, 2015; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016], reducing the efficacy of available antimicrobials. In addition, infections involving bacterial biofilms can increase hospitalization time and patient mortality rates, as well as high costs to patient and government [KART et al., 2014; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; KAYE; GALES; DUBOURG, 2017].

Natural riparins are compounds obtained from green fruit and calyx of *Aniba riparia* [BARBOSA-FILHO et al., 1987], predominantly distributed in tropical and subtropical regions, as in the Amazon region of Brazil and popularly known as "louro" [BARBOSA et al., 1998]. They have a broad-spectrum of biological activities such as:

antimicrobial, antispasmodic, anxiolytic, and antidepressant [BARBOSA-FILHO et al., 1987; THOMAS et al., 1994; CATÃO et al., 2005; MELO et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2011].

Antimicrobial activity of natural riparins I, II and III was previously determined by quantitative methods against ATCC strains *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* and *K. pneumoniae*, and qualitative method in *S. aureus* and *Escherichia coli* MDR strains [BARBOSA et al., 1988; CATÃO et al., 2005]. Riparins I, II and III have also been evaluated in the elimination of resistance plasmids in methicillin-sensitive *S. aureus*, where riparin III showed a potential for elimination of penicillin resistance plasmids in 61.7% of the isolates. However, natural riparins I, II and III were not evaluated for their antimicrobial activity and antibiofilm, and possible ultrastructural changes induced *in vitro* in MDR clinical isolates, as well as elucidation of the mechanisms of action of natural riparins I, II and III.

The decreased of the efficiency of available antimicrobials occurs because of the high spread of bacterial resistance. Then, the aim of this study was to investigate the antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic activity of riparins (I, II and III), and analysis of ultrastructural changes *in vitro* against *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa* MDR clinical isolates, contributing to studies of the development of new therapeutic options for HAI's.

## Results

Riparin I, II and III were tested for cytotoxicity against Vero cells line. Riparin II showed the cytotoxic concentration in 50% of cells ( $CC_{50}$ ) of 174.3  $\mu\text{g/mL}$ , considered the compound with lower toxicity, followed by riparin I (144.1  $\mu\text{g/mL}$ ) and riparin III (142.0  $\mu\text{g/mL}$ ). Oxacillin and meropenem exhibited slightly less cytotoxic concentrations compared to riparins, 162.9  $\mu\text{g/mL}$  and 182.7  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Hemolytic action of riparins was verified in human erythrocytes, which were shown low hemolytic percentage, ranging from 8.61% to 25.99%. Antimicrobial agents evaluated showed hemolysis of 17.57% for oxacillin and 10.88% for meropenem (Fig. 1).

Minimum inhibitory (MIC) and bactericidal concentration (MBC) of riparins I, II and III were determined by broth microdilution. In the analysis, only riparin III showed antimicrobial activity of 50  $\mu\text{g/mL}$  in *S. aureus* ATCC and *A. baumannii* ATCC only at the highest concentration tested (400  $\mu\text{g/mL}$ ). Then, riparin III was evaluated only in MDR clinical isolates of the respective bacterial species and susceptible concentrations. This compound exhibited antimicrobial activity in all five *S. aureus* MDR isolates at concentrations tested, with MIC and MBC of 50  $\mu\text{g/mL}$ . Of the five *A. baumannii* MDR isolates, three were susceptible to riparin III only at the highest concentration tested with MIC and MBC of 400  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 2).

Antibiofilm activity of riparin III was determined only in MDR clinical isolates and biofilm formers susceptible to riparin III. At first, all MDR clinical isolates of *S. aureus* were classified as moderate biofilm formers, while all MDR clinical isolates of *A. baumannii* were described as strong biofilm formers. Through analysis of optical density of the isolates ( $OD_i$ ) compared to the optical density of the controls ( $OD_c$ ), it was observed that the presence of riparin III significantly inhibited the biofilm formation of all *S. aureus* isolates evaluated, later classified as weak biofilm formers ( $OD_c < OD_x \leq 2x OD_c$ ). In *A. baumannii* isolates, riparin III induced biofilm formation, where these isolates remained as strong biofilm formers ( $4x OD_c < OD_i$ ) (Fig. 3).

Scanning electron microscopy (SEM) shows control cells of *S. aureus* and *A. baumannii* with intact surface without morphological changes. *S. aureus* strains not-submitted to riparin III showed structures in grapelike clusters of cells, and *A. baumannii* strains were observed with coccobacillus morphology. Control cells exposed to DMSO showed that the concentration of the solvent used (1%) did not

interfere in the proliferation or structure and bacterial morphology (Fig. **4A-4B**). *A. baumannii* isolates exposed to riparin III was observed a reduction in the number of cells and apparent morphological changes, such as existence of elongated cells without visualization of the bacterial septum, besides numerous cells with a rugged appearance on the cell surface (Fig. **4C-4E**). There was a morphology change in *S. aureus* treated with riparin III, with tear-shaped bacterial cells, as well as cytoplasmic material extravasation and cellular disruption (cell lysis), and protuberances and sharp roughness on the surface of the cell wall (Fig. **4D-4F**).

## Discussion

A systematic review on the antimicrobial potential of plant extracts of interest of the Sistema Único de Saúde (SUS) between 2010-2013 found 21,357 articles citing that discussions on therapeutic alternatives to the conventional treatment of bacterial diseases are necessary [MARMITT et al., 2015].

There are few reports of the antimicrobial action of riparins I, II and III in bacterial species. Our data demonstrate the antimicrobial activity of riparin III against *S. aureus* and *A. baumannii* MDR isolates. Previous studies have described the antimicrobial activity of calyx and green fruits extracts of *A. riparia* in bacterial and fungal strains [BARBOSA-FILHO et al., 1987; BARBOSA et al., 1988]. The present study confirms these data, however, it also presents the first report on the antimicrobial activity of riparin III against of *S. aureus* MDR clinical isolates, resistant to methicillin and ciprofloxacin, and carriers of virulence genes (unpublished data), besides *A. baumannii* clinical isolates resistant to colistin, meropenem and imipenem.

Among species analyzed, *S. aureus* and *A. baumannii* were susceptible to the tested concentrations of riparin III. According to the literature, Gram-positive species are more sensitivity when submitted to plant extracts, compared to Gram-negative species [FERREIRA et al., 2010], due to double membrane presented in Gram-negative bacteria, which is responsible for the microbial resistance to the plant extracts [FRANCESCATO, 2007; FERREIRA et al., 2010]. Despite the resistance of Gram-negative bacteria to plant extracts, in our study, sensitivity was observed in isolates of *A. baumannii* submitted to riparin III in the higher concentration tested, including multidrug-resistance isolates. This result is similar to those obtained by other authors who also observed little antimicrobial action of *A. riparia* against Gram-negative bacterial agents [BARBOSA et al., 1988; CATÃO et al., 2005].

Cytotoxicity of riparins was determined by MTT assay in Vero cells, which that is widely used to measure cell proliferation and cytotoxicity in different cell lines [JO et al., 2015; SASHIDHARA et al., 2015; SILVA et al., 2016]. Compared to oxacillin (162.9  $\mu\text{g/mL}$ ) and meropenem (182.7  $\mu\text{g/mL}$ ), the natural riparins I, II and III presented similar cytotoxic concentrations (144.1  $\mu\text{g/mL}$ , 174.3  $\mu\text{g/mL}$  and 142.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectively). According to Bunel et al. [2014], this technique may or may not to complete the analysis of certain compound, being the first step of *in vitro* assays. In studies investigating the biological activity of plant compounds, toxicity should be

related to cell lines *in vitro*, especially observing the appropriate concentrations and incubation times [BUNEL et al., 2014]. However, if the natural compound exhibits high cytotoxic concentration *in vitro*, it does not necessarily ensures similar results *in vivo* [OLIVEIRA et al., 2017].

In the research performed by Yamaguchi & Veiga-Junior [2013], it was observed a low percentage of cell viability of essential oils of leaves and branches of *Endlicheria citriodorapela* (Lauraceae) by MTT assay compared to control, ranging from 72,6% to 109,8%, in addition to low hemolytic activity (1,22 - 625  $\mu\text{g/mL}$ ). In our analysis, the percentage of cell viability in the presence of riparins ranged from 36,44% to 76,08%, where they did not reach 50% of cytotoxicity. The low hemolytic percentage of riparins suggests that these do not cause damage to the membranes of human erythrocytes. The stability of the erythrocyte membrane is reference for observe the absence of damage caused by compounds in cytotoxicity screens [SHARMA; SHARMA, 2001]. This indicates that analyzes should be performed with riparin III, since it exhibits low hemolytic percentage in human erythrocytes at the concentrations tested.

MDR clinical isolates of *S. aureus* and *A. baumannii* evaluated in this study are moderate and strong biofilm formers, respectively. Biofilm formation becomes extremely relevant to different bacterial species to ensure their survival in hostile environmental conditions in the presence of antimicrobial and phagocytic action [ERIKSSON et al., 2017]. Due to the low availability of effective antimicrobials to eradicate or minimize infections by isolates with high virulence potential, it is necessary to develop an alternative to combat this mechanism [CIOFU et al., 2015; RYBTKE et al., 2015]. There are no previous studies on the analysis of antibiofilm activity of riparins I, II or III, being this the first report of the interference of riparin III in biofilm formation of *S. aureus*.

SEM has been used to observe the extracellular activity of phagocytic agents, antimicrobials and plant compounds in bacterial isolates [LAI et al., 2011; SILVA et al., 2013; VERAS et al., 2015]. However, no previous research has described possible morphological changes in *S. aureus* and *A. baumannii* submitted to riparin III. In this study, morphological changes were observed in bacterial species exposed for 18h to riparin III similar to studies describing the action of antimicrobials in bacterial species, as described by Monson et al. [2010], Siqueira et al. [2014] e

Veras et al. [2015]. This may indicate that riparin III has the site of action similar to those described in studies with antimicrobials available against bacterial species.

Zajmi et al. [2015] compared the ultrastructural changes of *S. aureus* treated with streptomycin (synthetic compound) and artonin E (natural compound). SEM micrographs showed several damages in bacterial cell wall, including partial and total cellular rupture, besides the detection of extracellular filamentous materials. Another study analyzed the ultrastructural changes caused for polymyxin B and meropenem and the association between polymyxin B and meropenem in two MDR isolates of *K. pneumoniae* carriers of *bla<sub>KPC-2</sub>* gene [SCAVUZZI et al., 2016]. Authors report a significant reduction in number of bacterial cells, in addition to several morphological changes, including oval and spherical forms, aberrant or indefinite forms, cell elongating, and loss of cytoplasmic material confirmed by transmission electron microscopy. These data are similar to those described in our study, where morphological changes were observed, such as cell elongating, roughness, tear-shape, cell disruption (cell lysis), cell surface protuberances, and significant reduction in bacterial cells.

From the development of this study it is understood that plant compounds should be carefully analyzed as to their performance in MDR bacterial species, due to high dissemination of resistance bacterial. Thus, it was observed that riparin III presents antimicrobial activity against clinical isolates carriers of resistance and virulence genes, besides promoting several morphological changes and possessing potential of inhibition of biofilm formation in *S. aureus* isolates, indicating possible analyzes of new therapeutic options of HAI's involved *S. aureus*.

## Materials and methods

### Natural riparins I, II and III

Natural riparins I, II and III were obtained from the green fruit and calyx of *Aniba riparia*, belonging to the family Lauraceae, according to the methodology established in the Department of Biochemistry and Pharmacology of Universidade Federal do Piauí/UFPI.

### ATCC strains and clinical isolates

Riparins I, II and III were tested against *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) strains. Five MDR clinical isolates from *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa* were obtained from two public hospitals in Recife/PE by spontaneous demand and surveillance between 2013 and 2014, without contact with patients or medical records, described in figure 5. Bacterial identification and determination of antimicrobial resistance profile obtained by automated system VITEK-2 (*Biomerieux*) was provided by hospitals source. Bacterial isolates were stored in 20% glycerol at temperature of -80°C in bacterioteca of Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Departamento de Parasitologia no Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ/PE. Five non-clonal MDR clinical isolates of *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa* were included in the study.

### MTT assay

Cytotoxicity of natural riparins (I, II and III) and antimicrobials (oxacillin and meropenem) was evaluated on Vero cells line through tetrazolium salt assay (3- (4,5-*Dimethylthiazol-2-yl*)-2,5-*diphenyltetrazolium bromide*), described by Mosmann (1983). Cells ( $1 \times 10^5$  cells/mL) were added RPMI with phenol red supplemented with 10% fetal bovine serum in 96-well microplates. Cells were incubated in atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, and treated with riparins I, II and III at concentrations different (400 µg/mL to 3,125 µg/mL) for 24h [CATÃO et al., 2010]. Then, 10 µL of MTT (5 mg/mL) was added for 3h at 37°C. Formazan crystals were solubilized in DMSO and their absorbance was measured at 540 nm in spectrophotometer (Benchmark plus -

Bio-Rad®, California, USA). Each assay was performed in quadruplicate in two independent experiments.

#### Hemolysis test

Hemolytic activity (CAAE: 39858214.2.0000.5208) was described by Becerra et al. [2012] at riparin concentrations: 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 3,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [CATÃO et al., 2010] and evaluated in two independent experiments in quadruplicate. Natural riparins (I, II and III) and antimicrobials (oxacillin and meropenem) were solubilized in DMSO and diluted in saline solution (0.85% NaCl and 10 nM  $\text{CaCl}_2$ ) in 96-well microplates. Similarly, 2 mL of homogenized blood were dissolved in saline solution and centrifuged at 2,500 rpm for 2 min. After incubation for 3h at 37°C under constant agitation, microplates were centrifuged at 3,500 rpm for 4 min at 4°C. Supernatant was removed to another microplate to read absorbance in spectrophotometer at 540 nm to estimate the percentage of hemolysis by the equation:  $\% = (\text{Absorbance of the treated} - \text{Absorbance of the negative control}) \times 100 / (\text{Absorbance of the positive control} - \text{Absorbance of the control negative})$ .

#### Minimum inhibitory and bactericidal concentration

Natural riparins I, II and III were tested against ATCC strains of *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. The bacterial concentration ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL) of MDR clinical isolates of the susceptible species were subjected to presence of the evaluated compound. Riparins were diluted in DMSO to perform the microdilution in broth at the concentrations: 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 3,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [CATÃO et al., 2010], adapted from the standards established by CLSI [2017]. After incubation for 18-14h at  $37^\circ\text{C} \pm 1$ , the concentrations that showed antimicrobial activity were seeded on BHI agar and incubated for 18-24h at  $37^\circ\text{C} \pm 1$  for counting of colony forming units (CFU), followed by colorimetric test analysis with the addition of 20  $\mu\text{L}$  of resazurin [PALOMINO et al., 2002].

#### Biofilm formation

Biofilm formation analysis was adapted from the technique described by Stepanović et al. [2000]. All susceptible isolates to riparins were tested for biofilm formation. In microplates (96 wells) were added 200  $\mu\text{L}$  of bacterial suspensions and incubated for

24h at  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . Suspensions were removed, followed by washes with sterile saline (200  $\mu\text{L}$ ) and drying. Then crystal violet was added for 15 min and water washes. In microplate was added 200  $\mu\text{L}$  of ethanol for 30 min and absorbance at 570 nm (Benchmark Plus, Bio-Rad ®, California, USA). Isolates were classified as non-adherent ( $\text{ODi} \leq \text{ODc}$ ), weakly adherent ( $\text{ODc} < \text{ODi} < 2 \times \text{ODc}$ ), moderately adherent ( $2 \times \text{ODc} < \text{ODx} \leq 4 \times \text{ODc}$ ), or strongly adherent ( $4 \times \text{ODc} < \text{ODi}$ ).

#### Antibiofilm activity

Antibiofilm activity was described by Stepanović et al. [2000] with adaptations. Only the compound with antimicrobial activity in MDR clinical isolates was tested on biofilm forming isolates. Two isolates of *S. aureus* (170 and 184) were selected due to resistance to oxacillin, ciprofloxacin, and the presence of virulence genes: *icaAD*, *hlg*, *tst* and *luk* (unpublished data). Other two clinical isolates of *A. baumannii* (54 and 808) included showed resistance to colistin, imipenem and meropenem, being carriers of virulence genes: *csuE*, *ompA*, *basC* and *pilA* (unpublished data). In microplate (96 wells), 1 cm of sterile catheter embedded by 200  $\mu\text{L}$  of solution: culture medium, riparin III and adjusted inoculum was added. After incubation period ( $37\pm 1^\circ\text{C}/24\text{h}$ ), the catheter was removed, washed with 0.1M phosphate buffer and fixed. In parallel, bacterial suspensions were removed of the microplates, washed with sterile saline and dried at  $55\text{-}60^\circ\text{C}$  for 40-60 min. Crystal violet was added for 15 min and washing by immersion in water. Thus, ethanol was added in the microplate for 30 min and read in spectrophotometry at 570 nm (Benchmark plus, Bio-Rad®, California, USA). The mean optical density (ODi) of each isolate was classified [STEPANOVIĆ et al., 2000], which was compared to the optical density of the negative control (ODc).

#### Scanning electron microscopy

MDR clinical isolates of each species susceptible to the compound with antimicrobial activity against clinical isolates were selected. These were submitted to sub-MICs for 18h, being 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for *S. aureus* and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for *A. baumannii* isolates. All isolates were washed in 0.1 M phosphate buffer (pH, 7.4) for further fixation in 0.1 M phosphate buffer and 2.5% glutaraldehyde. Post-fixation was performed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer for 90 min. They were then washed in

0.1 M phosphate buffer for further dehydration with ethanol (30, 50, 70, 90 and 100%) for 10 min each step. After critical point and subsequent assembly in metal stubs were realized using a double carbon tape [VERAS et al., 2015]. Then, metallization was performed with a thin layer of gold for visualization in JEOL JSM-5600 LV scanning electron microscope.

#### Statistical analysis

Cytotoxic concentration was determined by linear regression analysis using SPSS 18.0 program (IBM Co., New York, USA) for Windows. Analysis of significance of the antibiofilm activity of riparin III, considering significant values  $p < 0.05$ , was described by ANOVA and Student's T-test using GraphPad Prism 5.0 (Graphpad, California, USA) for Windows.

#### Referências

Alves RCC, das Mercês PFF, de Souza IRA, de Almeida CMA, da Silva APS, Lima VLM et al. Antimicrobial activity of seaweeds of Pernambuco, northeastern coast of Brazil. *Afr J Microbiol Res* 2016; 10(10): 312-8.

Barbosa RCSBC, Giesbrecht AM, Barbosa-Filho JM, Yoshida M, Gottlieb OR. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. *Acta Amazônica* 1988; 8(1/2): 91-94. Suplemento.

Barbosa-Filho JM, Yoshid M, Gottlieb OR, Barbosa RCSBC, Giesbrecht AM, Young MCM. Benzoyl esters and amides, stryrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry* 1987; 26(9): 2615-7.

Becerra MC Guiñazú N, Hergert LY, Pellegrini A, Mazzieri MR, Gea S et al. *In vitro* activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and trypomastigote forms. *Exp Parasitol* 2012; 131(1): 57-62.

Bunel V, Ouedraogo M, Nguyen AT, Stévigny C, Duez P. Methods applied to the *in vitro* primary toxicology testing of natural products: State of the art, strengths, and limits. *Planta Med* 2014; 80(14): 1210-26.

Catão RMR, Barbosa-Filho JM, Gutierrez SJC, Lima EOL, Pereira MSV, Arruda TA et al. Evaluation of the antimicrobial activity about multiresistents samples of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Rev Bras Anál Clin* 2005; 37(4): 247-49.

Catão RMR, Barbosa-Filho JM, Lima EOL, Pereira MSV, Silva MAR, Arruda TA et al. Evaluation of the antimicrobial activity and biological effect by riparins about

elimination the resistance of drugs in samples of *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Anál Clín 2005; 42(1): 9-14.

Ciofu O, Olker-Nielsen T, Jensen PØ, Wang H, Høiby N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. Adv Drug Deliv Rev 2015; 85: 7-23.

CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 27<sup>a</sup> ed. CLSI suplemento M100. Wayne PA: Clinical & Laboratory Standards Institute, 2017.

Di Domenico EG, Farulla I, Prignano G, Gallo MT, Vespaziani M, Cavallo I et al. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. Int J Mol Sci 2017; 18(5): E1077.

Eller SCWS, Feitosa VA, Arruda TA, Antunes RMP, Catão RMR. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. Rev Ciênc Farm Básica Apl 2015; 36(1): 131-36.

Eriksson, S. van der Plas MJA, Mörgelin M, Sonesson A. Antibacterial and anti-biofilm effects of sodium hypochlorite against *Staphylococcus aureus* isolates derived from patients with atopic dermatitis. Br J Dermatol 2017; 177(2): 513-21.

Ferreira SB, Palmeira JD, Souza JH, de Almeida JM; Figueiredo MCP, Pequeno AS et al. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Anál Clín 2010; 42(1): 7-31.

Forzza RC, Leitman PM, Costa A, de Carvalho-Júnior AA, Peixoto AL, Walter BMT et al. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Org. Rafaela Campostrini Forzza et al: Andrea Jakobsson Estúdio/Jardim Botânico do Rio de Janeiro, vol. 1. 1699p. 2010.

Francescato LN, Deuschle RAN, Mallmann CA, Alves SH, Heinzmann BM. Antimicrobial activity of *Senecio heterotrichius* DC. Rev Bras Ciênc Farm 2007; 43(2): 239-45.

Kart D, Tavernier S, Van Acker H, Nelis HJ, Coenye T. Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. Biofouling 2014; 30(3): 377-83.

Kaye KS, Gales AC, Dubourg G. Old antibiotics for multidrug-resistant pathogens: from in vitro activity to clinical outcomes. Inter J Antimicrob Agents 2017; 49(5): 542-8.

Jo HY, Kim Y, Park HW, Moon HE, Bae S, Kim JW et al. The Unreliability of MTT Assay in the cytotoxic test of primary cultured glioblastoma cells. Exp Neurobiol 2015; 24(3): 235-45.

Lai MJ, Lin NT, Hu A, Soo PC, Chen LK, Chen LH et al. Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage 6AB2 endolysin (LysAB2) against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 90(2): 529-39.

Marmitt DJ, Rempel C, Goettert MI, Silva AC. Medical plants with potential antifungal properties listed in the RENISUS inventory. *Rev Bras Pesq Saúde* 2015; 17(3): 151-62.

Melo CTV, Monteiro AP, Leite CP, de Araújo FL, Lima VT, Barbosa-Filho JM et al. Anxiolytic-like effects of (O-Methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (*Lauraceae*) in Mice. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(3): 451-4.

Monson BK, Stringham J, Jones BB, Abdel-Aziz S, Peck CMC, Olson RJ. Scanning electron microscopy visualization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after contact with gatifloxacin with and without preservative. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010; 26(2): 133-6.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.

Oliveira JF, Lima TS, Vendramini-Costa DB, de Lacerda Pedrosa SCB, Lafayette EA, da Silva RMF et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. *Eur J Med Chem* 2017; 136: 305-14.

Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(8): 2720-2.

Rybtke M, Hultqvist LD, Givskov M, Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. *J Mol Biol* 2015; 427(23): 3628-45.

Santajit S, Indrawattana I. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 2475067.

Sashidhara KV, Rao KB, Kushwaha P, Modukuri RK, Singh P, Soni I et al. Novel chalcone-thiazole hybrids as potent inhibitors of drug resistant *Staphylococcus aureus*. *J Am Chem Soc* 2015; 6(7): 809-13.

Scavuzzi AML, Alves LC, Veras DL, Brayner FA, Lopes ACS. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla<sub>KPC-2</sub> gene. *J Med Microbiol* 2016; 65(12): 1370-7.

Sharland M, Saroey P, Berezin EN. A ameaça global da resistência antimicrobiana – a necessidade de instrumentos de vigilância padronizados para definir carga e desenvolver intervenções. *J Pediatr* 2015; 91(5): 410-2.

Sharma P, Sharma JD. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol* 2001; 74(3): 239-43.

Silva LCN, Sandes JM, de Paiva MM, de Araújo JM, de Figueiredo RC, da Silva MV et al. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat Prod Res* 2013; 27(16): 1492-6.

Silva ALL, Araújo MGS, Bastos MLA, Bernardo THL, Oliveira JFS, Silva-Junior EF et al. Evaluation of antibacterial, cytotoxic, and antioxidant activity of the plant species *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill. *Rev Bras PI Med* 2016; 18(1 supl. I): 307-15.

Siqueira VLD, Cardoso RF, Caleffi-Ferracioli KR, Scodro RBL, Fernandez MA, Fiorini A et al. structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(7): 3957–67.

Stepanović S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40(2): 175-9.

Teixeira CP, de Melo CT, de Araújo FL, de Carvalho AM, Silva MI, Barbosa-Filho JM et al. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *J Pharm Pharmacol* 2011; 27(2): 129-37.

Thomas G, Branco UJ, Barbosa Filho JM, Bachelet M, Vargaftig BB. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea pig alveolar leucocytes. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46(2): 103-7.

Veras DL, Lopes ACS, da Silva GV, Gonçalves GGA, de Freitas CF, de Lima FCG, Maciel MAV et al. Ultrastructural changes in clinical and microbiota isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of genes bla<sub>SHV</sub>, bla<sub>TEM</sub>, bla<sub>CTX-M</sub> or bla<sub>KPC</sub> when subject to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Sci World J* 2015; 2015: 1-13.

Yamaguchi KKL, Veiga-Junior VF. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. *Quim Nova* 2013; 36(6): 826-30.

Zajmi A, Hashim NM, Noordin MI, Khalifa SAM, Ramli F, Ali HM et al. Ultrastructural study on the antibacterial activity of artonin e versus streptomycin against *Staphylococcus aureus* strains. *Plos One* 2015; 10(6): e0128157.

## Legends for figures

Fig. 1 Investigation of cytotoxic concentration in Vero cells line and hemolytic percentage in human erythrocytes of riparins (I, II and III) and available antimicrobials.

Fig. 2 Minimum inhibitory and bactericidal concentration of riparin III against ATCC strains and multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from to public hospitals in Recife/PE.

Fig. 3 Optical density (OD) of biofilms of MDR isolates of *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* exposed to riparin III. For the analysis of significance, we used ANOVA and post-test Student's t test. Values \*\* differ significantly between experimental conditions ( $p < 0.05$ ).

Fig. 4 Electromyography of ultrastructural changes induced by action of riparin III in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* by scanning electron microscopy.

Fig. 5 Characterization and antimicrobial resistance profile of multidrug-resistant clinical isolates obtained from two public hospitals in Recife/PE.

Fig. 1

Compound	Cytotoxicity	
	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	% hemolytic
Riparin I	144,1±4,24	9,01±1,92
Riparin II	174,3±9,08	8,61±3,89
Riparin III	142,0±21,7	25,99±1,37
OXA	162,9±14,7	17,57±5,97
MPM	182,7±14,7	10,88±2,67

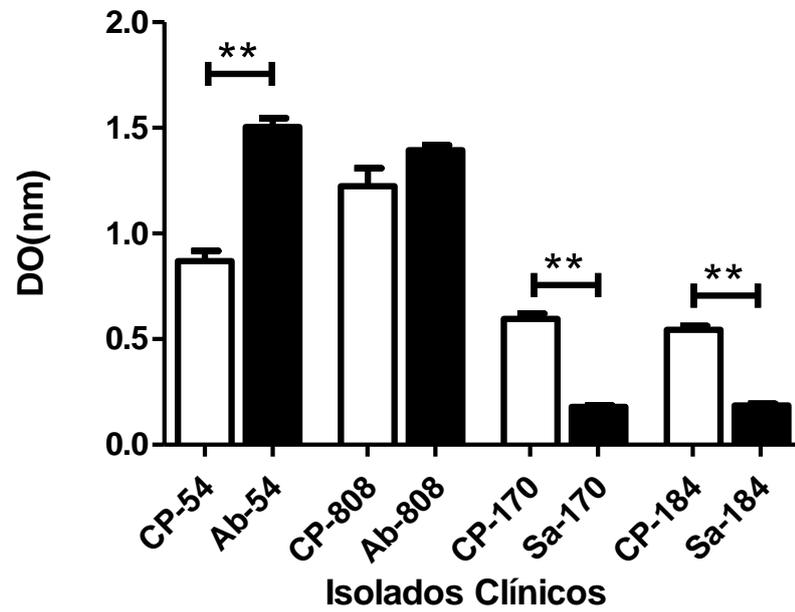
Subtitle: CC<sub>50</sub>, Cytotoxic concentration in 50% of cells; OXA, Oxacillin; MPM, Meropenem.

Fig. 2

Riparin III					
<i>S. aureus</i>			<i>A. baumannii</i>		
Isolate	MIC	MBC	Isolate	MIC	MBC
<b>170</b>	50 $\mu\text{g/mL}$		<b>54</b>	400 $\mu\text{g/mL}$	
<b>184</b>	50 $\mu\text{g/mL}$		<b>113</b>	-	
<b>186</b>	50 $\mu\text{g/mL}$		<b>379</b>	400 $\mu\text{g/mL}$	
<b>382</b>	50 $\mu\text{g/mL}$		<b>570</b>	-	
<b>454</b>	50 $\mu\text{g/mL}$		<b>808</b>	400 $\mu\text{g/mL}$	
<b>ATCC</b>	50 $\mu\text{g/mL}$		<b>ATCC</b>	400 $\mu\text{g/mL}$	

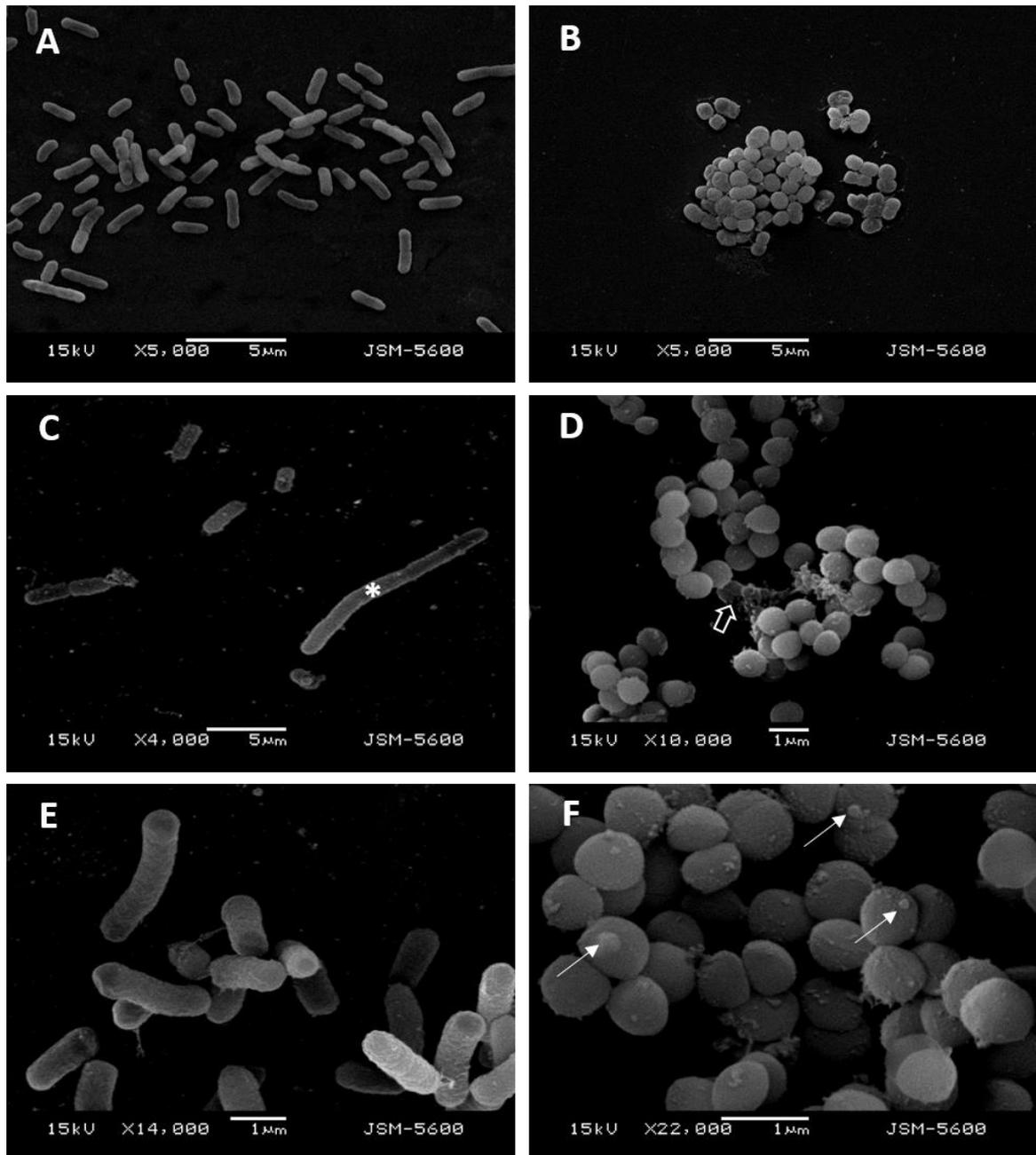
Subtitle: -, without antimicrobial activity; MIC, Minimum Inhibitory Concentration; MBC, Minimum Bactericidal Concentration.

Fig. 3



Subtitle: OD(nm), optical density (nanometers); CP, positive control without riparin III; Ab, *Acinetobacter baumannii*; Sa, *Staphylococcus aureus*. \*\* (p < 0.05).

Fig. 4



A. DMSO-treated *A. baumannii* control cells; B. DMSO-treated *S. aureus* control cells; C. *A. baumannii* after exposure to riparin III ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) for 18 h - asterisk indicates cell elongation and absence of septum formation, and reduction in the number of bacterial cells was verified; D. *S. aureus* after exposure to riparin III ( $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) for 18 h - arrow indicates cytoplasmic extravasation due to cell rupture, in addition to cells with indefinite morphologies; E. *A. baumannii* submitted to riparin III ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) for 18h - several bacterial cells with a pronounced rough appearance on the cell wall and indefinite morphology are observed; F. Riparin III-treated *S. aureus* ( $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) for 18 h - arrows show defragmentation on the cell surface and protuberances, besides rough appearance and morphology unusual to the species.

Fig. 5

BACTERIAL SPECIES	ISOLATE	SAMPLES	HOSPITALS	SECTORS	RESISTANCE
<i>A. baumannii</i>	54	Catheter tip	A	UCI	AMI, AMP, CAZ, CIP, COL, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM
<i>A. baumannii</i>	113	Right Foot Injury	B	NUR	CAZ, CIP, CPM, CTX, IPM, MPM, PPT
<i>A. baumannii</i>	379	Cerebrospinal fluid /Abdomen	A	UCI	AMI, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN, IPM, MPM
<i>A. baumannii</i>	570	Blood culture	A	UCI	AMP, CAZ, CFX, CFX/A, CIP, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM
<i>A. baumannii</i>	808	Cerebrospinal fluid	B	UCI	AMP, CAZ, CIP, CPM, CRO, CRX, CRX/A, GEN, IPM, MPM
<i>S. aureus</i>	170	Blood culture	A	NUR	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	184	Secreção Fístula Perna Esquerda	B	AMB	CIP, CLI, ERI, GEN, MOX, NOR, OXA, PEN, RIF, TRI
<i>S. aureus</i>	186	Fragment of bone	A	NUR	CIP, CLI, ERI, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	382	Catheter tip	B	NUR	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	454	Operative wound	B	NUR	CIP, CLI, ERI, MOR, NOR, OXA
<i>K. pneumoniae</i>	94	Blood	A	NUR	AMC, AMP, CAZ, CIP, CPM, CTN, CTX, ERT, LEV, PPT, TMP-SMX,
<i>K. pneumoniae</i>	265	Urine	A	UCI	AMI, AMP, ASB, CAZ, CIP, CPM, CRO, CRX/A, CTX, ERT, GEN, IMP, MER

<i>K. pneumoniae</i>	483	Nasal swab	B	NUR	AMP, ASB, AZT, CAZ, CIP, CPM, CTN, CTX, ERT, IMP, PPT
<i>K. pneumoniae</i>	652	Rectal swab	B	NUR	AMP, ASB, AZT, CAZ, CPM, CTN, CTX, CRO, ERT, GEN, IMP, MPM, PPT
<i>K. pneumoniae</i>	952	Nasal swab	B	UCI	AMP, ASB, AZT, CFO, CTN, CPM, CRO, CTX, CIP, ERT, GEN, IMP, PPT
<i>P. aeruginosa</i>	14	Tracheobronchial secretion	A	UCI	AMI, CAZ, CIP, CRO, GEN, IPM, MPM,
<i>P. aeruginosa</i>	23	Secretion of arm	A	NUR	AMI, AZT, CAZ, CIP, CTX, GEN, IPM, MPM, PPT
<i>P. aeruginosa</i>	575	Urine	B	NUR	AMI, AZT, CAZ, CIP, CTX, GEN, IPM, MPM, PPT
<i>P. aeruginosa</i>	611	Fragment of bone	A	NUR	CAZ, CIP, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM
<i>P. aeruginosa</i>	682	Urine	A	NUR	AMI, CAZ, CIP, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM

**Subtitle:** A, hospital 1; B, hospital 2; AMB, Ambulatory; NUR, Nursery; UCI, Intensive Care Unit; AMI, Amikacin; AMP, Ampicillin; AZT, Aztreonam; ASB, Ampicillin/Sulbactam; CAZ, Ceftazidime; CIP, Ciprofloxacin; COL, Colistin; CPM, Cefepime; CRO, Ceftriaxone; CRX, Cefuroxime; CRX/A, Cefuroxime/Axetil; CTN, Cephalothin; CTX, Cefotaxime; GEN, Gentamycin; IPM, Imipenem; MPM, Meropenem; PEN, Benzilpenicilina; PPT, Piperacillin/Tazobactam; TMP-SMX, Trimetopim/Sulfamethoxazole.

## APÊNDICE B

Caracterização e perfil de resistência a antimicrobianos de isolados clínicos multidroga-resistentes obtidos em dois hospitais públicos do Recife/PE.

ESPÉCIES BACTERIANAS	ISOLADOS	AMOSTRAS BIOLÓGICAS	HOSPITAIS	SETORES	RESISTÊNCIA
<i>A. baumannii</i>	54	Ponta de cateter	A	UTI	AMI, AMP, CAZ, CIP, COL, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM
<i>A. baumannii</i>	113	Lesão Pé Direito	B	ENF	CAZ, CIP, CPM, CTX, IPM, MPM, PPT
<i>A. baumannii</i>	379	Líquor/Abdome	A	UTI	AMI, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN, IPM, MPM
<i>A. baumannii</i>	570	Hemocultura	A	UTI	AMP, CAZ, CFX, CFX/A, CIP, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM
<i>A. baumannii</i>	808	Líquor	B	UTI	AMP, CAZ, CIP, CPM, CRO, CRX, CRX/A, GEN, IPM, MPM
<i>S. aureus</i>	170	Hemocultura	A	ENF	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	184	Secreção Fístula Perna Esquerda	B	AMB	CIP, CLI, ERI, GEN, MOX, NOR, OXA, PEN, RIF, TRI
<i>S. aureus</i>	186	Fragmento de osso	A	ENF	CIP, CLI, ERI, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	382	Ponta de cateter	B	ENF	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	454	Ferida operatória	B	ENF	CIP, CLI, ERI, MOR, NOR, OXA
<i>K. pneumoniae</i>	94	Sangue	A	ENF	AMC, AMP, CAZ, CIP, CPM, CTN, CTX, ERT, LEV, PPT, TMP-SMX,

<i>K. pneumoniae</i>	265	Urina	A	UTI	AMI, AMP, ASB, CAZ, CIP, CPM, CRO, CRX/A, CTX, ERT, GEN, IMP, MER
<i>K. pneumoniae</i>	483	Swab nasal	B	ENF	AMP, ASB, AZT, CAZ, CIP, CPM, CTN, CTX, ERT, IMP, PPT
<i>K. pneumoniae</i>	652	Swab retal	B	ENF	AMP, ASB, AZT, CAZ, CPM, CTN, CTX, CRO, ERT, GEN, IMP, MPM, PPT
<i>K. pneumoniae</i>	952	Swab nasal	B	UTI	AMP, ASB, AZT, CFO, CTN, CPM, CRO, CTX, CIP, ERT, GEN, IMP, PPT
<i>P. aeruginosa</i>	14	Secreção traqueobrônquica	A	UTI	AMI, CAZ, CIP, CRO, GEN, IPM, MPM,
<i>P. aeruginosa</i>	23	Secreção do braço	A	ENF	AMI, AZT, CAZ, CIP, CTX, GEN, IPM, MPM, PPT
<i>P. aeruginosa</i>	575	Urina	B	ENF	AMI, AZT, CAZ, CIP, CTX, GEN, IPM, MPM, PPT
<i>P. aeruginosa</i>	611	Fragmento ósseo	A	ENF	CAZ, CIP, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM
<i>P. aeruginosa</i>	682	Urina	A	ENF	AMI, CAZ, CIP, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM

**Legenda:** A, hospital 1; B, hospital 2; AMB, Ambulatório; ENF, Enfermaria; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; AMI, Amicacina; AMP, Ampicilina; AZT, Aztreonam; ASB, Ampicilina/Sulbactam; CAZ, Ceftazidima; CIP, Ciprofloxacina; COL, Colistina; CPM, Cefepime; CRO, Ceftriaxona; CRX, Cefuroxima; CRX/A, Cefuroxima/Axetil; CTN, Cefalotina; CTX, Cefotaxima; GEN, Gentamicina; IPM, Imipenem; MPM, Meropenem; PEN, Benzilpenicilina; PPT, Piperacilina/Tazobactam; TMP-SMX, Trimetropim/Sulfametoxazol.