



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUANNE EUGÊNIA NUNES

**ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE β -LAPACHONA E ANTIMICROBIANOS FRENTE
A *Enterococcus faecalis* VANCOMICINA RESISTENTES: efeito sobre a formação
do biofilme e ultra-estrutura**

Recife
2019

LUANNE EUGÊNIA NUNES

**ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE β -LAPACHONA E ANTIMICROBIANOS FRENTE
A *Enterococcus faecalis* VANCOMICINA RESISTENTES: efeito sobre a formação
do biofilme e ultra-estrutura**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, como parte dos requisitos parciais para obtenção de título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Obtenção e avaliação de produtos naturais e compostos bioativos

Orientador: Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

N972a	Nunes, Luanne Eugênia Atividade sinérgica entre β-lapachona e antimicrobianos frente a <i>Enterococcus faecalis</i> vancomicina resistentes: efeito sobre a formação do biofilme e ultra-estrutura/ Luanne Eugênia Nunes. – 2019. 131 f. : il. fig., tab. Orientadora: Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2019. Inclui referências. 1. <i>Enterococcus</i>. 2. Infecção hospitalar. 3 Resistência a vancomicina. 4 Sinergismo farmacológico. I. Ximenes, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo (orientadora). II. Título. 617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2020 - 046)
-------	--

LUANNE EUGÊNIA NUNES

**ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE β -LAPACHONA E ANTIMICROBIANOS FRENTE
A *Enterococcus faecalis* VANCOMICINA RESISTENTES: efeito sobre a formação
do biofilme e ultra-estrutura**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, como parte dos requisitos parciais para obtenção de título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 15/03/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Profa. Dra. Ana Maria Souto-Maior
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. André de Lima Aires
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Kledoaldo Oliveira de Lima
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Aos meus pais, Eugênio e Vânia, com todo meu amor, e a minha irmã, Alanne Eugênia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua imensa misericórdia, bondade e proteção.

Aos meus pais, Eugênio e Vânia, por todo amor, compreensão, doação e incentivo constante. Agradeço por sempre acreditarem em mim e pelo empenho em tornar possíveis todos os meus sonhos. Sem esse precioso apoio, e constante dedicação nada disso seria possível.

À minha irmã Alanne Eugênia, por estar sempre ao meu lado e ser meu exemplo de perseverança.

À Prof^a Dra. Eulália de Azevedo Ximenes, minha orientadora, por sua confiança, imensa paciência, constante orientação, aprendizado imensurável e por sua preciosa amizade. Por o acalanto nos momentos de dificuldade e por seus conselhos tão valiosos e certos. A ela, minha gratidão.

À Prof^a Dra. Raíssa Mayer Ramalho Catão, minha eterna professora de microbiologia, por ter me acolhido em seu laboratório de pesquisa, ainda como aluna do curso de Farmácia na Universidade Estadual da Paraíba. A ela toda minha gratidão, pela amizade de todas as horas, pelos valiosos ensinamentos e pelas oportunidades concedidas durante a minha caminhada.

As minhas companheiras do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica dos Micro-organismos, Iane Fonseca, Cecília Cruz e Wilma Rocha pela alegria e parceria de todos os dias, foi fundamental nas longas jornadas experimentais. Em especial a Marina Rocha e a Raíssa Ximenes, pela primorosa amizade, pela dedicação e constante auxílio. A elas minha gratidão.

A todos do Departamento de Antibióticos que contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial aos secretários, Rilvan e Nerilin por todo o profissionalismo com que exercem as suas funções.

A Patrícia Campelo e Cristiane pela colaboração para realização deste trabalho.

A Capes.

As Professoras Dra. Mônica Camelo e Dra. Vláudia Costa, por disponibilizarem a infraestrutura do laboratório de parasitologia.

Ao colega Victor Hugo Barbosa, por sua disponibilidade em ajudar sempre que solicitado.

A Paulo César Dantas e a Wilma Rocha, meus companheiros de apartamento, pela amizade, parceria e paciência. Foi uma experiência enriquecedora dividir essa jornada com vocês.

Aos amigos, que mesmo distantes se fizeram presentes através das calorosas mensagens de incentivo.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação” (BEAUVOIR, 1958, p. 243).

RESUMO

Enterococcus vancomicina resistentes (EVR) têm emergido em todo o mundo, como causa importante de infecções nosocomiais, o que tem preocupado os órgãos governamentais ligados a saúde pública devido ao aumento da relação morbidade/mortalidade associadas às infecções por EVR. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo, a avaliação da atividade antimicrobiana de naftoquinonas (lapachol, α e β -lapachona) e de cinco agentes antimicrobianos (vancomicina, gentamicina, ampicilina, ciprofloxacino e linezolida) sobre cepas de *Enterococcus faecalis* multirresistentes (n=11) sendo uma ATCC 51299. Numa primeira etapa foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) destas substâncias e em seguida foi avaliada a interação dos antimicrobianos associados a β -lapachona pelo método *Checkerboard*. Os critérios utilizados para avaliar a atividade de interação foram definidos pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionada (Índice CIF). Por fim, a cinética bactericida, alterações ultraestruturais e a atividade a antibiofilme β -lapachona utilizada na CIM foi avaliada sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. As cepas de *Enterococcus faecalis* mostraram-se resistentes a todos os antimicrobianos testados, com valores de CIMs que variaram de 16 a 1024 $\mu\text{g/mL}$. Dentre as naftoquinonas, a β -lapachona foi mais ativa (CIM 320 – 160 $\mu\text{g/mL}$). Às associações foram sinérgicas, em sua maioria, com valores de ICIF que variaram de 0,04 a 0,75. Após 24 horas de exposição à β -lapachona – vancomicina foi observado um decréscimo no crescimento de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 de aproximadamente 2 $\log_{10}$ das Unidades Formadoras de Colônias/mL. Através da microscopia eletrônica verificou-se alterações da parede, membranas celulares, do conteúdo citoplasmático e lise celular. Também foi possível constatar inibição de aproximadamente 60% da formação do biofilme. Foi observado que, em sua grande maioria, as associações contendo β -lapachona agem sinergicamente sobre a viabilidade e formação do biofilme de cepas *Enterococcus faecalis*.

Palavras-chave: *Enterococcus*. Infecção hospitalar. Resistência a vancomicina. Sinergismo farmacológico.

ABSTRACT

Enterococcus vancomycin-resistant (EVR) have emerged around the world, as an important cause of nosocomial infections, which has worried government agencies linked to public health due to the increased morbidity / mortality ratio associated with EVR infections. Thus, the present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of naphthoquinones (lapachol, α and β -lapachone) and five antimicrobial agents (vancomycin, gentamicin, ampicillin, ciprofloxacin and linezolid) on multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* strains (n = 11) being an ATCC 51299. In a first step, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and minimum bactericide (MBC) of these substances were determined and then the interaction of antimicrobials associated with β -lapachone was evaluated by the Checkerboard method. The criteria used to assess the interaction activity were defined by the Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC Index). Finally, bactericidal kinetics, ultrastructural changes and β -lapachone antibiofilm activity used in MIC were evaluated on *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. The strains of *Enterococcus faecalis* proved to be resistant to all tested antimicrobials, with MIC values varying from 16 to 1024 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Among naphthoquinones, β -lapachone was more active (CIM 320 - 160 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Most associations were synergistic, with FIC Index values ranging from 0.04 to 0.75. After 24 hours of exposure to β -lapachone - vancomycin, a decrease in the growth of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 of approximately 2 $\log_{10}$ of Colony Forming Units/mL was observed. Through electron microscopy, changes in the wall, cell membranes, cytoplasmic content and cell lysis were observed. It was also possible to observe an inhibition of approximately 60% of biofilm formation. It was observed that, in the great majority, associations containing β -lapachone act synergistically on the viability and formation of the biofilm of *Enterococcus faecalis* strains.

Keywords: *Enterococcus*. Cross infection. Vancomycin resistance. Drug synergism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Posição filogenética dos gêneros <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> e <i>Lactococcus</i>	25
Figura 2 –	Etapas de formação do biofilme.....	36
Figura 3 –	Etapas do processo de adesão e formação de biofilmes em superfícies.....	37
Figura 4 –	Estrutura química da vancomicina.....	41
Figura 5 –	Estrutura química da Ampicilina.....	43
Figura 6 –	Ação dos β -lactâmicos na parede celular bacteriana.....	44
Figura 7 –	Estrutura química da gentamicina.....	45
Figura 8 –	Estrutura química do ciprofloxacino.....	46
Figura 9 –	Estrutura química da linezolida.....	47
Figura 10 –	Classificação das quinonas.....	48
Figura 11 –	Semeio de <i>Enterococcus faecalis</i> em MH.....	55
Figura 12 –	Identificação da produção da enzima catalase.....	56
Figura 13 –	Diagrama de distribuição dos antimicrobianos no método <i>Checkerboard</i>	63
Figura 14 –	Diagrama das associações dos antimicrobianos.....	64
Figura 15 –	Diagrama da cinética de morte pelo método <i>Time Kill Curves</i>	66
Figura 16 –	Diagrama das associações dos antimicrobianos utilizados para determinação da atividade anti-biofilme.....	68
Figura 17 –	<i>Enterococcus faecalis</i> pelo método de Gram.....	72
Figura 18 –	Identificação bioquímica de <i>Enterococcus faecalis</i>	73
Figura 19 –	Perfil de susceptibilidade de <i>E. faecalis</i> frente a antimicrobianos.....	74
Figura 20 –	Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com ampicilina frente às cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 51299, LFBM 421, LFBM 335, LFBM 918, LFBM 240, LFMB 417.....	80
Figura 21 –	Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com ampicilina frente às cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 168, LFBM 671, LFBM 189, LFBM 160, LFBM 272.....	81

Figura 22 –	Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com ciprofloxacina frente às cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 51299, LFBM 421, LFBM 335, LFBM 918, LFBM 240, LFMB 417.....	82
Figura 23 –	Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com ciprofloxacina frente às cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> LFMB168, LFMB 671, LFMB 189, LFBM 160, LFBM 272.....	83
Figura 24 –	Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com gentamicina frente às cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 51299, LFBM 421, LFBM 335, LFBM 918, LFBM 240, LFMB 417.....	84
Figura 25 –	Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com gentamicina frente às cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> LFMB168, LFMB 671, LFMB 189, LFMB 160, LFMB 272.....	85
Figura 26 –	Isoblograma revelando o efeito sinérgico β -Lapachona em associação com vancomicina frente às cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> LFBM 51299, LFBM 421, LFBM 335, LFBM 918, LFBM 240, LFMB 417.....	86
Figura 27 –	Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com vancomicina frente às cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> LFMB 168, LFMB 671, LFMB 189, LFMB 160, LFMB 272.....	87
Figura 28 –	Efeito da associação Vancomicina/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações inibitórias, frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 51299.....	89
Figura 29 –	Efeito da associação Gentamicina/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações inibitórias, frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 51299.....	89
Figura 30 –	Efeito da associação Ampicilina/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações inibitórias, frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 51299.....	90
Figura 31 –	Efeito da associação Linezolida/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações inibitórias, frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 51299.....	90

Figura 32 –	Efeito da associação vancomicina/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações subinibitórias (1/2 CIM), frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 51299.....	91
Figura 33 –	Efeito da associação gentamicina/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações subinibitórias (1/2 CIM), frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 51299.....	92
Figura 34 –	Efeito da associação ampicilina/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações subinibitórias (1/2 CIM), frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 51299.....	92
Figura 35 –	Efeito da associação linezolida/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações subinibitórias (1/2 CIM), frente a <i>E. faecalis</i> ATCC 51299.....	93
Figura 36 –	Imagens da microscopia eletrônica por transmissão da cepa padrão de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 tratada com a associação β -Lapachona/vancomicina nas respectivas CIM.....	94
Figura 37 –	Produção de biofilme pelo método de ágar vermelho congo.....	95
Figura 38 –	Avaliação da produção de biofilme pelo método da microplaca.....	96
Figura 39 –	Atividade antibiofilme de vancomicina e β -Lapachona isoladas e em associações.....	97
Figura 40 –	Percentual de redução na formação do biofilme.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Antimicrobianos e critérios de classificação da resistência.....	58
Tabela 2 –	Crítérios de interpretação dos valores de CIM.....	61
Tabela 3 –	Crítérios de classificação dos valores de ICIF.....	64
Tabela 4 –	Crítério de interpretação para produção de biofilme.....	70
Tabela 5 –	Identificação de <i>Enterococcus faecalis</i> por reações bioquímicas e fisiológicas.....	73
Tabela 6 –	Perfil de Susceptibilidade de cepas de <i>Enterococcus faecalis</i>	76
Tabela 7 –	Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima de naftoquinonas e agentes antimicrobianos frente a cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> multidroga resistentes.....	77
Tabela 8 –	Associação da β -Lapachona a agentes antimicrobianos frente a <i>Enterococcus faecalis</i> multidroga resistentes.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

Agg	Substância de Agregação
Ace	Proteína de adesão ao colágeno
AMH	Ágar Mueller-Hinton
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDCP	<i>Centre for Disease Control and Prevention</i>
CIP	Ciprofloxacino
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Caldo Mueller Hinton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
VER	<i>Enterococcus</i> Resistentes à Vancomicina
Esp	Proteína Extracelular de Superfície
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
GEN	Gentamicina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
INT	Cloridrato de 2-(4-Iodofenil)-3-(4-Nitrofenil)-5-phenil tetrazólio
LNZ	Linezolida
LTA	Ácido lipoteicóico
MER	Meropenem
MRSA	<i>Methicilin resistant Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
PBP	Proteína fixadora à penicilina
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossômico
SOD	Superóxido dismutase
TEM	Microscopia Eletrônica por Transmissão
TET	Tetraciclina

TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VAN	Vancomicina
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
α	Alfa
β	Betha
%	Porcentagem
mL	Milílitro
μL	Microlitro
μm	Micrometro
v/v	volume/volume
Log_{10}	Logaritmo decimal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
3.1	<i>Enterococcus</i>	24
3.2	EPIDEMIOLOGIA DO GÊNERO <i>Enterococcus</i>	26
3.3	PATOGENIA E INFECÇÕES.....	28
3.4	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	30
3.4.1	Proteínas de superfície.....	30
3.4.1.1	Proteína Extracelular de Superfície (Esp).....	30
3.4.1.2	Substância de Agregação (Agg).....	31
3.4.1.3	Fator de Colonização.....	32
3.4.2	Ácido Lipoteicóico (LTA).....	32
3.4.3	Produção de superóxido dismutase (SOD).....	33
3.4.4	Enzimas Hidrolíticas.....	34
3.4.4.1	Citolisina.....	34
3.4.4.2	Hialuronidase.....	35
3.4.4.3	Gelatinase.....	35
3.4.5	Biofilme.....	35
3.5	RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	38
3.5.1	Resistência Intrínseca.....	38
3.5.2	Resistência adquirida.....	39
3.6	ANTIMICROBIANOS AVALIADOS.....	41
3.6.1	Glicopeptídeos.....	41
3.6.2	β-Lactâmicos.....	42
3.6.3	Aminoglicosídeos.....	44
3.6.4	Fluorquinolonas.....	45
3.6.5	Oxazolidinonas.....	47
3.7	NAFTOQUINONAS.....	47
3.8	MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE	

	ANTIMICROBIANA.....	50
3.8.1	Associações de drogas.....	50
3.8.2	<i>Checkerboard</i> – Método do tabuleiro de xadrez.....	51
3.8.3	<i>Time Kill Curve</i> – Cinética de morte.....	52
4	MÉTODOS.....	54
4.1	IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	54
4.1.1	Micro-organismos.....	54
4.1.2	Isolamento.....	54
4.1.3	Identificação.....	55
4.1.3.1	Teste da catalase.....	55
4.1.3.2	Tolerância ao NaCl a 6,5%.....	56
4.1.3.3	Hidrolise da L-pirroglutamil- β -naftilamida (teste de PYR)	56
4.1.3.4	Hidrólise de esculina na presença de bile.....	56
4.1.3.5	Assimilação de carboidratos.....	57
4.1.3.6	Ágar telurito de potássio (K_2TeO_3)	57
4.1.3.7	Atividade hemolítica.....	57
4.1.4	Conservação.....	58
4.1.5	Determinação do Fenótipo de Resistência.....	58
4.1.6	Determinação das Concentrações Inibitórias e Bactericidas Mínimas (CIM e CBM)	59
4.1.6.1	Padronização do Inóculo.....	59
4.1.6.2	Agentes antimicrobianos.....	59
4.1.6.3	Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	59
4.1.6.4	Critérios de interpretação.....	60
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-ENTEROCOCCICA DA β-LAPACHONA ASSOCIADA A ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAIS.....	61
4.2.1	Micro-organismos.....	61
4.2.2	Agentes Antimicrobianos.....	61
4.2.3	Padronização do Inóculo.....	62

4.2.4	Avaliação da atividade antimicrobiana da associação da β-Lapachona a agentes antimicrobianos.....	62
4.2.5	Critérios de interpretação.....	63
4.3	CINÉTICA DE MORTE DE <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 E ALTERAÇÕES ULTRA-ESTRUTURAIS APÓS EXPOSIÇÃO A β -LAPACHONA E VANCOMICINA.....	64
4.3.1	Micro-organismos.....	64
4.3.2	Agentes Antimicrobianos.....	64
4.3.3	Meios de Cultura.....	65
4.3.4	Padronização do inóculo.....	65
4.3.5	Cinética de morte.....	65
4.3.6	Critérios de interpretação.....	66
4.3.7	Alterações ultra estruturais.....	67
4.4	AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE <i>Enterococcus faecalis</i> E ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA β -LAPACHONA, VANCOMICINA E SUA ASSOCIAÇÃO.....	67
4.4.1	Micro-organismos.....	67
4.4.2	4.4.2 Meio de cultura.....	68
4.4.3	Agentes Antimicrobianos.....	68
4.4.4	Triagem fenotípica para avaliar a formação de biofilme.....	69
4.4.5	Padronização do inóculo.....	69
4.4.6	Avaliação da formação de biofilme <i>in vitro</i>.....	69
4.4.7	Critérios de Interpretação.....	70
4.4.8	Determinação da atividade antibiofilme.....	70
5	RESULTADOS.....	72
5.1	IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	72
5.1.1	Identificação bioquímica das cepas clínicas de <i>E. faecalis</i>.....	72
5.1.2	Determinação do fenótipo de resistência.....	73
5.1.3	Determinação da atividade antimicrobiana.....	74
5.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA.....	75
5.3	EFEITO BACTERICIDA DAS DROGAS E SUAS ASSOCIAÇÕES....	88
5.3.1	Alterações ultraestruturais.....	93

5.4	BIOFILME.....	95
5.4.1	Produção de biofilme.....	95
5.4.2	Determinação da atividade antibiofilme.....	96
6	DISCUSSÃO.....	98
7	CONCLUSÃO.....	110
	REFERÊNCIAS.....	112

1 INTRODUÇÃO

A infecção hospitalar é um problema de saúde pública, que dificulta o tratamento adequado dos pacientes e apresenta um enorme impacto no índice de mortalidade. Estima-se que em países desenvolvidos as taxas de morte por infecção hospitalar variem entre 5 a 10% de todas as infecções (SOUZA *et al*, 2015; WEINER *et al*, 2016).

Durante os últimos anos, cepas de *Enterococcus* Resistentes à Vancomicina (ERV) tem emergido como um fator importante de infecção hospitalar em todo o mundo. O primeiro caso descrito de ERV surgiu em 1986 na Europa e logo depois, em 1987, nos Estados Unidos. Eles são o agente causal de infecções nosocomiais comportando-se, muitas vezes, como oportunistas. Estas infecções são de difícil tratamento devido a sua resistência intrínseca a vários antimicrobianos (FREIRE-MORAN *et al*, 2011; ARIAS; MURRAY, 2012; MORFIN-OTERO *et al*, 2018).

As espécies clinicamente importantes de ERV são: *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*. A resistência aos antimicrobianos pode ser de dois tipos: intrínseca, derivada de genes cromossômicos, e extrínsecos, como resultado de uma disseminação clonal, ou plasmídica, e se deve normalmente a produção de enzimas que inativam o agente antimicrobiano e seus sítios específicos. Esta resistência ocorre basicamente pela produção de precursores de peptideoglicano na parede celular que se ligam à vancomicina, impedindo assim sua ação no bloqueio da síntese de parede celular (ARAÚJO; MARCUCCI, 2011).

As infecções causadas por ERV são frequentemente encontradas na região intra-abdominal, no trato urinário, na corrente sanguínea. Infecção ou colonização por ERV tem sido associada à hospitalização prolongada em unidade de terapia intensiva (UTI), condições cirúrgicas, insuficiência renal crônica, e uso prévio de vancomicina (CANTON; RUIZ-GARBAJOSA, 2013).

A pesquisa por novas moléculas aplicadas a terapia anti-enterocócica é de grande importância e neste contexto surgem as naftoquinonas que são fitocompostos com ampla atividade farmacológica. Estes compostos têm atividade antitumoral, anti-inflamatória, anti-tripanosossoma, anti-malárica e atividade antimicrobiana. Estes podem agir como inibidores da enzima transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) e sobre topoisomerasas em células eucariontes e procariontes (FERREIRA *et al*, 2010; KOBAYASHI *et al*, 2011). Várias

naftoquinonas foram isoladas a partir da casca da árvore Lapacho (*Tabebuia avellanedae*) ou sintetizadas a partir de lapachol ou lomatol e suas estruturas químicas elucidadas (AKHTAR *et al*, 2012).

O aumento da resistência aos antimicrobianos vem sendo estudado por vários grupos de pesquisadores em todo o mundo. A prática indiscriminada da utilização de antimicrobianos associada com a alta frequência de mutantes resistentes é hoje uma realidade. Desta forma a procura por antimicrobianos mais eficazes e seguros, proporcionando aos usuários maior sucesso no tratamento é o objetivo maior (GUERREIRO *et al*, 2012).

Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo maior o estudo de naftoquinonas sob diversos parâmetros antimicrobianos com ênfase no estudo da associação entre a β -Lapachona com agentes antimicrobianos convencionais sobre *E. faecalis* multirresistentes cujo tratamento é extremamente limitado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana de naftoquinonas em associação com antimicrobianos convencionais frente a *Enterococcus faecalis* multirresistentes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar as Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM) das naftoquinonas, lapachol, α - lapachona, β -lapachona, sobre *Enterococcus faecalis* multirresistentes;
- II. Determinar, *in vitro*, o tipo de interação entre β -lapachona e agentes antimicrobianos (ampicilina, ciprofloxacino, gentamicina, linezolida e vancomicina) sobre *Enterococcus faecalis* multirresistentes;
- III. Avaliar o efeito bactericida da β -lapachona e dos antimicrobianos bem como de suas associações pelo método da cinética de morte (*time kill*);
- IV. Identificar a ocorrência de mudanças ou danos na morfologia das células microbianas quando em contato com a associação β -lapachona-vancomicina, através da observação por Microscopia Eletrônica por Transmissão (MET);
- V. Avaliar a atividade antibiofilme da β -lapachona, vancomicina e sua associação.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ENTEROCOCCUS

O gênero *Enterococcus*, pertencente à família Enterococcaceae, e constituem um importante grupo de micro-organismos que se destacam como patógenos oportunistas, cuja biologia e taxonomia têm passado por significativas alterações nos últimos anos (FACKLAM; TEIXEIRA; CARVALHO, 2002).

Enterococcus consistem em bactérias gram-positivas, identificadas bioquimicamente como catalase e oxidase negativas, anaeróbicas facultativas não formadoras de esporos. Que podem ocorrer tanto como cocos simples e em cadeias. Macroscopicamente se apresentam em colônias pequenas, amarelas, com 0,5 a 1 mm de diâmetro (MURRAY, 1990). Pertencem a um grupo de organismos conhecidos como Bactérias do Ácido Lático (LAB) produtoras de bacteriocinas (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2005).

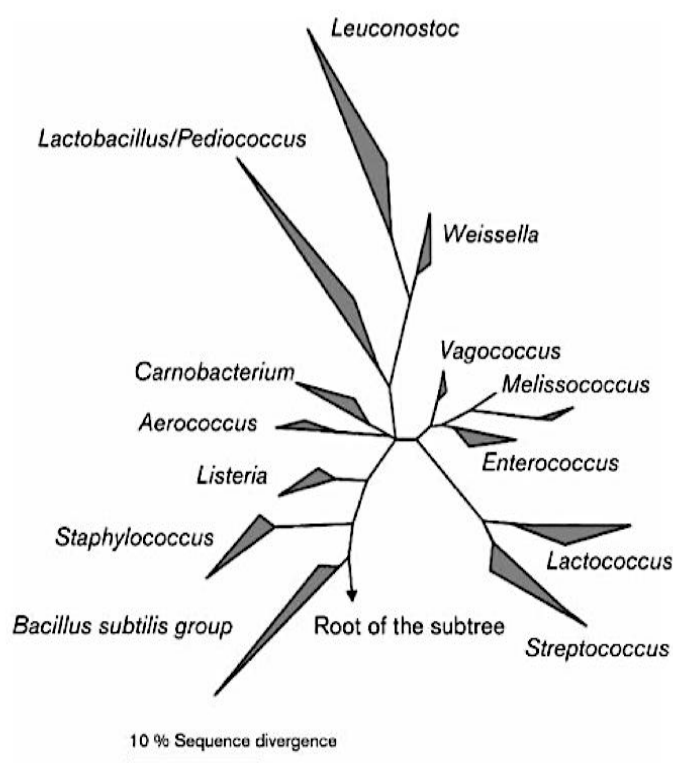
O termo “*entérocoque*” foi proposto inicialmente por Thiercelin na França, em 1899, o termo teve como referência à origem intestinal de novo diplococos Gram positivos (THIERCELIN, 1899). Anteriormente classificados como pertencentes ao gênero *Streptococcus*, os enterococos só foram diferenciados de outras espécies após a classificação sorológica proposta por Rebecca Lancefield em 1933 para o gênero *Streptococcus*. Esta classificação tem como base a composição dos antígenos bacterianos, mais precisamente poliosídeos C, presentes na parede celular.

Desta forma, os *Enterococcus* foram classificados como positivos para o antissoro do grupo D devido ao seu antígeno ácido teicóico, que é associado à membrana plasmática, diferenciando-os de outras espécies da família (LANCEFIELD, 1933). Sherman (1937) classificou espécies de *Streptococcus* em quatro subgrupos: lácticos, *viridans*, piogênicos e enterococos. Este último subgrupo era constituído por bactérias de origem fecal incluindo *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus liquefaciens*, *Streptococcus zymogenes* e *Streptococcus durans* (KOBAYAKAWA *et al*, 2005). Em 1984, técnicas de hibridização do DNA e a sequenciação da porção 16S do rRNA elucidou que estas espécies de *Streptococcus* diferiam muito das características do gênero *Streptococcus*, e assim

foram designadas como pertencentes ao novo gênero, *Enterococcus* (MURRAY, 1990; FOULQUIÉ-MORENO *et al*, 2006).

Com a criação do gênero, mais de 30 espécies foram transferidas do grupo *Streptococcus* para o *Enterococcus*. Já o grupo láctico foi reagrupado em um novo gênero denominado *Lactococcus*. Os dados moleculares que foram coletados permitiram o entendimento da relação entre as espécies de *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactococcus* (figura 1) (FISHER; PHILLIPS, 2009).

Figura 1 – Posição filogenética dos gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus*



Fonte: KLEIN, 2003.

Quanto a fisiologia, o gênero *Enterococcus* tem como principais características a capacidade de crescimento em condições adversas, tais como, em temperaturas de 10 a 45 °C, podendo sobreviver a temperaturas elevadas (60°C durante 30 minutos), resistem em uma ampla faixa de pH (4,6 – 9,9, sendo 7,5 considerado o ponto ótimo) e a altas concentrações de sais (6,5% de NaCl) e sais biliares (40%), o que os torna distintos de outros gêneros principalmente *Streptococcus* (MURRAY, 1990; LINDENSTRAUSS *et al*, 2013; TIAN *et al*, 2013).

Possuem capacidade de hidrolisar a L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) e hidrolisar a esculina em esculetina, principais testes para identificação. Apesar de não reagirem positivamente para a prova da enzima citocromo-oxidase, podem se mostrar positivo para prova da presença da catalase pela produção de uma pseudo catalase que se caracteriza por uma ligeira liberação de oxigênio quando a colônia é colocada em contato com o peróxido de hidrogênio (SHERMAN, 1937; MURRAY, 1990).

Quanto à hemólise em ágar sangue, a origem do sangue pode definir o comportamento do gênero que é variável podendo ser α , β hemolíticos ou não hemolíticos, quando se utiliza sangue humano ou de cavalo na confecção do meio à hemólise é baseada na atividade da citolisina e a reação é β -hemolítica. Na maioria dos casos, estes testes são úteis para diferenciar os membros do gênero *Enterococcus* dos outros gêneros de cocos Gram-positivos, catalase-negativos (DOMING *et al*, 2003; KONEMANN, 2009).

Atualmente, foram descritas mais de 50 espécies diferentes de *Enterococcus*, com *E. faecalis* e *E. faecium* como as espécies clinicamente relevantes (SIEVERT *et al*, 2013; EUZÉBY, 2015). O interesse em estudos com estes patógenos ganhou proeminência devido a associação às crescentes manifestações clínicas como causadores de infecções e por apresentarem elevada resistência aos antimicrobianos tradicionalmente utilizados para tratamento dessas infecções (CANTON; RUIZ-GARBAJOSA, 2013).

Dentre as espécies do gênero, *Enterococcus faecalis* corresponde cerca de 80% a 85% das infecções nosocomiais seguida por *E. faecium* (BØHLE *et al*, 2011; JAHANSEPAS *et al*, 2018). *E. faecalis* é o agente causal de endocardite infecciosa (EI), uma condição infecciosa grave cuja taxa de mortalidade varia de 20% a 40%, que permanecem inalteradas nas últimas três décadas, apesar dos avanços na terapia antimicrobiana (JOHANSSON; RASMUSSEN, 2013; MIRO; PERICAS; RIO, 2013; BEGANOVIC *et al*, 2018).

3.2 EPIDEMIOLOGIA DO GÊNERO *ENTEROCOCCUS*

Enterococcus são micro-organismos de baixa virulência e que são encontrados habitando comensalmente o trato gastrointestinal de animais e humanos, chegando a ser isolados em concentrações de 10^5 a 10^7 UFC por grama

de fezes. Porém, podem ser encontrados, com menor frequência, na cavidade oral, vesícula biliar, pele e trato genitourinário (TYNE *et al*, 2013).

Também podem ser encontrados no solo, em alimentos, na água, em animais, pássaros e insetos por contaminação de fezes. Podem ser isolados em alimentos, principalmente produtos lácteos, carnes e peixes (TEIXEIRA; FACKLAM, 2002; CAUWERTS, 2007). A alta resistência dos *Enterococcus* às elevadas temperaturas, como é o caso dos processos de esterilização, explica o aparecimento de espécies desse gênero em alimentos industrializados (SEGLEY *et al*, 2004).

Por se tratar de uma bactéria oportunista, apresenta uma grande incidência em pacientes hospitalizados, não só devido o seu perfil de virulência, mas porque o próprio hospital se torna uma incubadora (BROWN *et al.*, 2006). De acordo com NNIS (*National Nosocomial Infection Surveillance*), *Enterococcus faecalis* é o terceiro patógeno mais comum a nível mundial nas seguintes infecções hospitalares: trato urinário, intra-abdominal, cirúrgica e associadas a cateteres. Sendo raros os casos de infecções por esse gênero no sistema nervoso central (ASLAM, 2010, WANG *et al*, 2014).

A *World Health Organization* (WHO) classificou as espécies do gênero *Enterococcus*, resistentes a vancomicina, como prioridade para a descoberta de novas estratégias terapêuticas que sejam eficazes. As espécies Vancomicina resistentes estão amplamente distribuídas em hospitais por todo o mundo, com a prevalênciavariando de acordo com a localização geográfica. Nos hospitais dos EUA, *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, é um importante patógeno clínico, particularmente em pacientes imunossuprimidos e em estado clínico crítico (WEINER *et al*, 2016; O'DRISCOLL; CRANK, 2017; GAO; HOWDEN; STINEAR, 2018).

Estudos epidemiológicos da Rede Nacional de Segurança em Saúde, nos Estados Unidos, indicam que 82% das cepas de *E. faecium* recuperados de infecções da corrente sanguínea são resistentes à vancomicina, enquanto 9,8% das cepas de *E. faecalis* apresentaram resistência ao glicopeptídeo (WEINER *et al*, 2016; RIOS *et al*, 2019).

Segundo Weiner *et al* (2016), o CDCP entre 2011-2014 notificou 30.034 (7,4%) casos de infecções hospitalares causadas por *E. faecalis*, correspondendo ao quinto lugar nas notificações. O relatório do ano de 2016 do Centro de Doenças e

Controle (ECDC) descreve que a prevalência geral de cepas *Enterococcus* resistentes a vancomicina chega a 30%, com variações entre países.

Um estudo multicêntrico focado em quatro países do norte da América do Sul (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela), encontrou uma prevalência de *E. faecium* resistentes a vancomicina, com taxa média de 31%. No Brasil, a prevalência é maior, chegando a 60% de resistência a vancomicina (PANESSO *et al*, 2010; SACRAMENTO *et al*, 2017; RIOS *et al*, 2019).

Compreender o mecanismo por trás da resistência é essencial para reduzir as terapias clínicas que selecionem micro-organismos resistentes, como *Enterococcus faecalis*. Nestas condições, pode ocorrer a proliferação de cepas resistentes que aumentam a probabilidade de infecções ou torna os pacientes mais suscetíveis à colonização por estes micro-organismos (STIEFEL *et al*, 2014). Quando estas infecções se desenvolvem por *Enterococcus faecalis* vancomicina resistente, a taxa de mortalidade se eleva. A prevalência de cepas de *E. faecalis* resistentes à vancomicina tem aumentado (ANVISA, 2016; WHO, 2018).

Segundo as notificações do PNPCIRAS (Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde), em 2016 o gênero *Enterococcus* foi classificado como o sétimo patógeno causador de IPCSL (Infecção Primária de Corrente Sanguínea Laboratorial) associada à CVC (Catéter Venoso Central). Foram avaliados pacientes hospitalizados em UTI adulto, pediátrica e neonatal, sendo notificados percentuais de 6, 5,7 e 3,6, respectivamente, nessas unidades. Destas notificações, um percentual de 25,8% UTI adulto, 10,9% UTI pediátrica e 5,5% em UTI neonatal de pacientes notificados com micro-organismos do gênero *Enterococcus* foram classificados com fenótipo de resistência à vancomicina (ANVISA, 2016).

3.3 PATOGENIA E INFECÇÕES

Enterococcus são membros da microbiota normal do trato gastrointestinal, sendo também encontrados nas mucosas de outros tratos, embora em menor concentração. Muitos fatores intrínsecos ao micro-organismo determinam a virulência dos *Enterococcus*, se iniciando por sua capacidade de colonizar e interagir com células e proteínas do trato gastrointestinal e por isso terem a capacidade de

invadir sítios extra intestinais e causarem infecções (CETINKAYA *et al*, 2000; LINDER, 2007).

Enterococcus estão entre os agentes mais comumente identificados em infecções hospitalares. As fontes destas infecções causadas por esses micro-organismos são resumidas em duas: a causada por micro-organismos presentes no trato gastrointestinal do próprio paciente e a adquirida por contaminação do ambiente hospitalar. Neste caso, a bactéria é transmitida no hospital através do fluxo da equipe de saúde, que se contaminam com as roupas e objetos dos pacientes e com o manuseio dos equipamentos (FURTADO *et al*, 2006; SILVERT *et al*, 2013).

As infecções surgem quando a bactéria é translocada para órgãos ou locais sensíveis. O emprego de antibióticos de largo espectro, a presença de cateteres urinários ou intravasculares, assim como a hospitalização prolongada representam importantes fatores predisponentes à aquisição de infecção enterocócica (FARON; LEDEBOER; BUCHAN, 2016).

As infecções por *E. faecalis* podem ser oriundas da flora microbiana comensal do paciente, onde estes micro-organismos poderão ser transferidos de indivíduo para indivíduo ou adquiridos através do consumo de água ou alimentos contaminados (WERNER *et al*, 2008). São, portanto, uma ameaça para a saúde humana, principalmente devido à grande resistência adquirida contra um largo número de antimicrobianos, o que impossibilita a sua erradicação. Alguns fatores não microbiológicos, como é o caso do consumo de agentes antimicrobianos de forma incorreta ou desnecessária aliado a hábitos precários de higiene, contribuem para a evolução e perda de controle destas infecções (VIGNAROLI *et al*, 2011).

As infecções enterocócicas estão associadas a várias manifestações clínicas, incluindo bacteremias, septicemias, endocardite infecciosa, infecções intra-abdominal e pélvica, do trato urinário e, em casos raros, no sistema nervo central (HILL *et al*, 2007; SIEVERT *et al*, 2013; WANG *et al*, 2014).

Estes micro-organismos estão também bastante relacionados com endocardites, bacteremias, septicemias e são constantemente isolados em falhas endodônticas, nomeadamente nos canais radiculares. Cerca de 90% destas infeções devem-se exclusivamente a *E. faecalis* encontrado em canais obturados (FOLQUIÉ-MORENO *et al*, 2006).

O controle periódico da disseminação de amostras resistentes aos múltiplos antimicrobianos é recomendado pela vigilância epidemiológica, a fim de detectar as

fontes de transmissão e reduzir a possibilidade da emergência de surtos hospitalares (FARON; LEDEBOER; BUCHAN, 2016).

3.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência, são substâncias isoladas ou em forma de complexos que compõem as estratégias que as bactérias lançam para colonizar e invadir os tecidos do hospedeiro, percorrendo as células epiteliais e tornando-se muitas vezes imperceptíveis ao sistema imunológico. Estas estratégias estão geralmente relacionadas as cepas nosocomiais, pois, o ambiente hospitalar facilita a aquisição de fatores exógenos, o que aumenta diretamente a capacidade de infecção em relação as cepas comensais (PARADELLA *et al*, 2007).

O aumento da resistência dos micro-organismos nosocomiais aos agentes antimicrobianos e as proteínas de superfície celular, permite uma maior extensão dos nichos de colonização quando comparados as outras cepas com menor patogenicidade (MUNDY *et al*, 2000).

A produção e excreção desses fatores pela célula microbiana são codificados por plasmídeos conjugativos, ou por rearranjos no genoma. A expressão desses fatores não é essencial para a sobrevivência da cepa, porem contribui para o aumento da patogenicidade e como consequência, o agravamento da infecção instalada (OGIER *et al*, 2008).

Muitos fatores intrínsecos ao micro-organismo determinam a virulência dos *Enterococcus*, se iniciando por sua capacidade de colonizar e interagir com células e proteínas do trato gastrointestinal e por isso terem a capacidade de invadir sítios extra intestinais e causarem infecções (FISHER; PHILLIPS, 2009).

3.4.1 Proteínas de superfície

3.4.1.1 Proteína Extracelular de Superfície (Esp)

Enterococcus expressam adesinas como a proteína extracelular de superfície (Esp), que promove além da adesão, a colonização e a invasão do sistema imunológico, o que influencia no aumentada resistência aos agentes antimicrobianos. A Esp é uma proteína codificada pelo gene *esp*, é constituída por

1873 aminoácidos e apresenta um domínio N-terminal, que se encontra na superfície da parede celular, e é um dos fatores responsáveis pela interação com o tecido hospedeiro (FISHER; PHILLIPS, 2009).

Algumas modificações estruturais nesta proteína podem impedir o reconhecimento do micro-organismo pelo sistema imunológico do hospedeiro, favorecendo a colonização e a permanência no sítio da infecção (SHANKAR *et al*, 1999). O gene *esp*, que codifica a proteína, é detectado majoritariamente em isolados clínicos, mas não é comum em indivíduos saudáveis. Esta condição contribui para a transmissão nosocomial e para a persistência de *Enterococcus* nas células endoteliais do trato urinário e/ou endocardite em modelos experimentais na matrix extracelular do hospedeiro humano (CARLOS *et al*, 2010).

Alguns estudos relataram que esta proteína está correlacionada com a produção de biofilme por *Enterococcus*. É descrito que a produção de biofilme aumenta em grande escala após a introdução do gene responsável pela expressão desta proteína (TOLLEDO-ARANA *et al*, 2001; TENDOLKAR *et al*, 2005; PARADELLA *et al*, 2007).

3.4.1.2 Substância de Agregação (Agg)

A substância de agregação é uma glicoproteína de superfície presente nos plasmídeos de *E. faecalis*. Em *Enterococcus* os genes codificadosres da Agg são o *asp1*, *asc10* e *asa1* e os respectivos plasmídeos de conjugação são pPD1, pCF10 e pAD1. A produção é induzida por feromonas e promove a formação de agregados durante a conjugação bacteriana, o que auxilia a transferência de plasmídeos e impulsiona a adesão a superfície das células receptoras (POETA *et al*, 2005; HENDRICKX *et al*, 2009).

Esta proteína, Agg, contém também duas sequências de aminoácidos Arg-Gly-Asp, reconhecidas por integrinas (receptores membranares). O epitélio intestinal apresenta estas integrinas, permitindo a translocação da bactéria através da barreira epitelial. Este fator promove a aderência e invasão dos microrganismos que o apresentam (ABERNA *et al*, 2011).

A presença da Agg aumenta a hidrofobicidade da superfície da célula, promovendo a localização do colesterol para o fagossoma, prevenindo ou atrasando a fusão com as vesículas lisossomas (KOCH *et al*, 2004). Esta proteína medeia a

ligação específica ao epitélio intestinal, as células epiteliais renais, neutrófilos humanos e macrófagos, facilitando assim a colonização e formação de vegetações (FOLQUIÉ-MORENO *et al*, 2006).

3.4.1.3 Fator de Colonização

O fator de colonização a proteína de adesão ao colágeno (Ace) resulta da expressão do gene *ace*. É uma proteína de superfície *collagen-binding* e pertence à família MSCRAMM (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) que é composta por adesinas de *Enterococcus*, essenciais nos estágios iniciais da infecção pois se liga a componentes da matriz extracelular das células do hospedeiro (ARIAS; MURRAY, 2012). A proteína Ace medeia as ligações entre a célula bacteriana e o tecido do hospedeiro através da interação com o colágeno tipo I e IV, a dentina e laminina (RICH *et al*, 1999; HUBBLE *et al*, 2003).

A proteína é produzida em condições fisiológicas específicas, onde o aumento da expressão acontece na presença de certos estímulos ambientais, como a presença de soro, sais biliares e altas temperaturas. A Ace tem um papel importante em algumas infecções provocadas por *Enterococcus*, pois estudos revelaram que cepas de *E. faecalis* mutantes de *ace* cresceram atenuadas em diferentes modelos de estudo, incluindo macrófagos murínicos, infecção de trato urinário e endocardite experimental. Estes resultados sugerem a importância da Ace como fator de virulência (KOCH *et al*, 2004; NALLAPAREDDY; MURRAY, 2006; LEBRETON *et al*, 2009, SINGH *et al*, 2010).

3.4.2 Ácido Lipoteicóico (LTA)

Enterococcus produz um importante fator de virulência, o ácido lipoteicóico (LTA), que é semelhante aos lipopolissacarídeos provenientes das bactérias Gram-negativas, que se encontra na superfície das células e inibe a autólise das paredes celulares intactas ou isoladas, é o primeiro fator a ter contato com as células hospedeiras e iniciar uma resposta inflamatória (BAIK *et al*, 2011).

O ácido lipoteicóico possui estrutura anfipática, sendo formado por ligação de poliglicerofosfatos e ácidos graxos. Este polímero de glicerofosfato ou ribitolfosfato, covalentemente ligado ao glicolípido na membrana citoplasmática e projetando-se

através da camada de peptidoglicano, é considerado essencial ao crescimento bacteriano (VAN AMERSFOORT *et al*, 2003; SIQUEIRA JUNIOR; ROCAS, 2007).

Segundo Kayaoglu; Orstavik (2004), o LTA atua como estimulador de leucócitos, monócitos e macrófagos na liberação de mediadores inflamatórios, como o TNF- α (fator de necrose tumoral), a interleucina-1- β , enzimas lisossomais e prostaglandinas E2, que liberam mediadores inflamatórios que podem ampliar o dano tecidual.

Durante a infecção, são produzidos anticorpos específicos contra o LTA, portanto, está envolvido na resposta inflamatória, síndrome séptica, formação de biofilme e adesão ao dente (FABRETTI *et al*, 2006; HAN *et al*, 2006; LEE *et al*, 2009). Além de ser importante no papel da formação da substância de agregação, na transferência de plasmídeos, e na formação do biofilme contribuindo para a virulência do micro-organismo (BAIK *et al*, 2008).

3.4.3 Produção de Superóxido Dismutase (SOD)

O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), assim como outras espécies reativas de oxigênio (ROS) exercem um efeito destrutivo sobre uma variedade de componentes biológicos como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. A produção de superóxido pelos neutrófilos e por outras células fagocitárias é essencial para a morte do micro-organismo, no entanto, causa dano tecidual no local da inflamação (KAYAOGU et al, 2004).

Enterococcus desenvolveu enzimas e não mecanismos enzimáticos para combater os efeitos deletérios do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), que variam de danos na fita do DNA à peroxidação de lipídios da membrana (IMLAY, 2003; PEPPOLONI *et al*, 2011).

A superóxido dismutase (SOD), uma metaloenzima, codificada pelo gene *sodA*, que catalisa a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular, é um elemento essencial do sistema de defesa antioxidante primário de *E. faecalis*, considerado um dos maiores mecanismos de defesa das células contra o *stress* oxidativo. Auxilia, assim, a bactéria a colonizar mais facilmente membranas celulares sem comprometer a sua sobrevivência (VERNEUIL *et al*, 2006).

3.4.4 Enzimas Hidrolíticas

3.4.4.1 Citolisina

A citolisina, também denominada hemolisina, foi um dos primeiros fatores de virulência estudado. São toxinas hemolíticas de células sanguíneas de humanos as quais podem atuar também como bacteriocinas. Este fator tem demonstrado um importante papel na primeira etapa dos processos infecciosos, ainda na fase assintomática, contribuindo para a penetração nos tecidos. As cepas de *Enterococcus* são produtoras da citolisina quando expressão o gene *cyl*, aumentando o nível de virulência quando comparado as demais (COX *et al*, 2005). A sua atividade celular contribui para elevar a citotoxicidade das infecções causadas por *E. faecalis* (IZUMI *et al*, 2005).

A proteína é codificada em cromossomas ou plasmídeos transmissíveis, e consiste em um sistema peptídico (*CylLL* e *CylLS*). Porém, a produção é realizada por um processo complexo que requer o produto de 8 genes que perfazem o seu operão: *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA* e *cylI* (SHANKAR *et al*, 2004).

Os genes *cylLL* e *cylLS* correspondem às unidades estruturais da enzima, os genes *cylM*, *cylB*, *cylA* são responsáveis por modificações traducionais e o gene *cylI* é responsável pela imunidade celular. Estes seis genes são transcritos como uma unidade e os genes *cylR1* e *cylR2* possuem funções reguladoras e correspondem à segunda unidade transcripcional. Por fim, as duas subunidades (*CylLL* e *CylLS*) estruturais são modificadas pelo produto do gene *cylM* e transportadas para o meio extracelular, onde são ativadas por uma protease codificada por *cylA*, o que resulta na produção da citolisina funcional (COBURN *et al*, 2003; SHANKAR *et al*, 2004).

A citolisina é regulada por *quorum-sensing*, embora alterações na concentração em oxigênio também possam mediar a sua expressão. Assim, condições anaeróbicas promovem um aumento na produção de citolisina (KOCH *et al*, 2004).

3.4.4.2 Hialuronidase

As hialuronidasas compõe o grupo de enzimas hidrolíticas que potencializam a virulência de *Enterococcus*, e são codificadas pelo gene cromossomal *hyl*. Estas enzimas atuam de modo degradativo no ácido hialurônico que é um glucosaminoglicano encontrado no tecido conetivo, neural e epitelial e por isso estão associadas a danos teciduais (SEMEDO *et al*, 2003). Sugerindo assim, que as bactérias que possuam esta enzima estejam associadas a doenças invasivas (WORTH *et al*, 2008).

As enzimas são capazes de despolimerizar os mucopolissacarídeos do tecido conjuntivo, facilitando a colonização dos *Enterococcus* e dos seus metabólitos, as toxinas, nos tecidos do hospedeiro (KAYAOGLU *et al*, 2004). A enzima também atua no fornecimento de nutrientes à bactéria, pois os produtos de degradação do seu substrato são dissacarídeos, que podem ser metabolizados pelo micro-organismo (HYNES *et al*, 2000).

3.4.4.3 Gelatinase

A gelatinase é uma metaloprotease de zinco extracelular codificada pelo gene *gelE* e constituída por resíduos de histidina, cujos locais de ligação são ocupados pelos íons de zinco. Possui natureza hidrofóbica e sua expressão é mediada pelo *quorum sensing*, por compor o grupo de preoteases bacterianas tem como função fornecer nutrientes peptídicos ao micro-organismo (THURLOW *et al*, 2010).

São enzimas que podem ocasionar danos aos tecidos do hospedeiro, e podem ser classificadas como fatores de virulência pois hidrolisam um largo espectro de substratos do hospedeiro, incluindo o colágeno, fibrinogênio, fibrina, gelatina e caseína (THOMAS *et al*, 2008). A gelatinase é geralmente produzida por *Enterococcus* provenientes de infecções nosocomiais, fecais ou de isolados clínicos (LOPES *et al*, 2006).

3.4.5 Biofilme

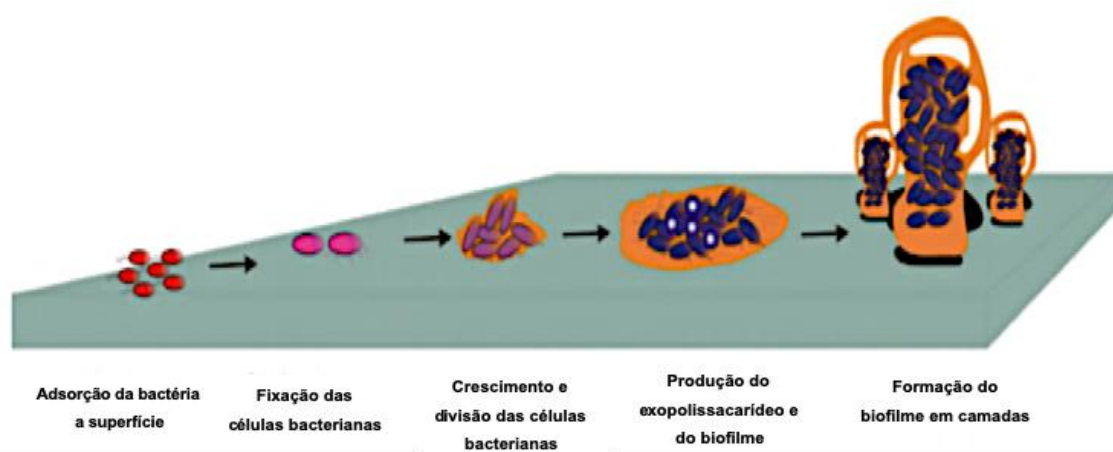
Um importante fator de virulência de *Enterococcus* é a capacidade de produção de biofilme, mecanismo de proteção desenvolvido por micro-organismos,

que aumenta a capacidade de colonização no sítio infeccioso, como também dificulta a ação de agentes antimicrobianos (WATNICK; KOLTER, 2000; SHRIDHAR; DHANASHREE, 2019).

Os biofilmes são populações bacterianas que são encontradas como agregados ligados à superfície contidos em uma matriz hidratada de polissacarídeo extracelular compreendendo polissacarídeos, proteínas, glicopeptídeos, ácidos nucléicos e lipídios (COSTERTON, 2001; FLEMMING; WINGENDER, 2010). A adesão a superfícies é um mecanismo eficiente para permanência em um microambiente com condições hostis. Ademais, estudos relatam ser a fase microbiana planctônica, um mecanismo de translocação (THALLINGER *et al*, 2013).

Estudos genéticos demonstraram que a formação do biofilme é um processo complexo que começa com a adsorção de bactérias na superfície de materiais sólidos, seguido de fixação, crescimento e secreção de polissacarídeos extracelulares requerem sinalização intercelulare demonstram um perfil de transcrição gênica que difere das células planctônicas (WATNICK; KOLTER, 2000), estas etapas são descritas na figura 2:

Figura 2 – Etapas de formação do biofilme

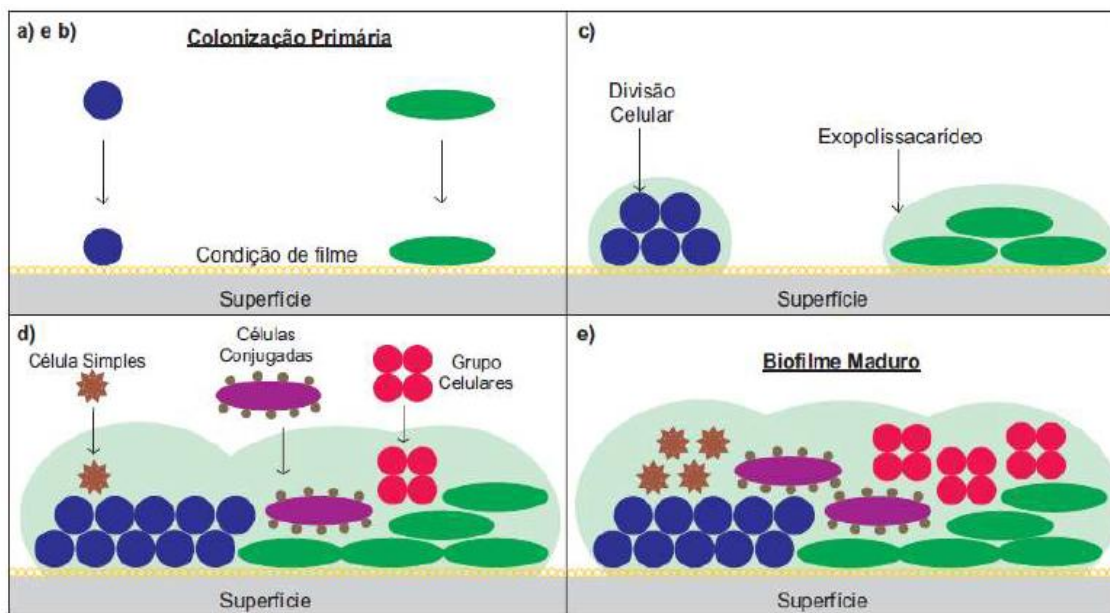


Fonte: THALLINGER *et al*, 2013.

Como descrito na figura 3, as células bacterianas se ligam a uma superfície configurando o estágio de pré-adesão ao substrato (a), seguida da adesão reversível onde ocorre a interação celular com a superfície de suporte e sua colonização inicial (b) na terceira etapa ocorre adesão irreversível, que se caracteriza pelo aspecto

“amontoado” das células aderidas entre si e à superfície com produção de exopolissacarídeos (EPS) (c), a incorporação de novos grupos de micro-organismos e a maturação do biofilme e início da liberação de células planctônicas (d) e (e).

Figura 3 – Etapas do processo de adesão e formação de biofilmes em superfícies



Fonte: Adaptado de FORSYTHE, 2002.

O *quorum sensing*, processo onde ocorre a liberação de moléculas de sinalização intercelular, é um importante mecanismo durante a formação do polissacarídeo extracelular no biofilme. As moléculas sensíveis a este mecanismo de sinalização permitem que as bactérias detectem a presença de outras bactérias e que haja a comunicação entre elas. O aumento na concentração de moléculas de sinalização pode interferir na expressão de muitos genes, incluindo genes que codificam a produção de adesinas, exopolissacarídeos e outros fatores de virulência (THALLINGER *et al*, 2013).

Acredita-se que micro-organismos produtores de biofilme apresentam elevada resistência a antimicrobianos quando comparada as correspondentes formas planctônicas, seja pela diminuição da penetração do antibiótico através da matriz do biofilme, seja pela expressão de mecanismos mais complexos de resistência como, a transferência horizontal de genes entre as células microbianas, específicos da matriz (DAVIES; DAVIES, 2010; SOBISCH *et al*, 2019).

Assim, estudos relatam que mais de 65% das infecções hospitalares ocorrem devido à capacidade de produção de biofilme pelos micro-organismos, onde estes causam infecções recorrentes, crônicas e de elevada resistência a drogas

antimicrobianas (LINDSAY; VON HOLY, 2006; MONIRI *et al*, 2013; SCHIWON *et al*, 2013).

A capacidade dos *Enterococcus* para formar biofilmes pode conferir vantagem ecológica em certas situações, no caso de cepas clínicas de *E. faecalis* isoladas de pacientes com endocardite infecciosa foram significativamente associadas à maior formação de biofilme quando comparado aos isolados clínicos de não endocardite; Estudos sugerem que essa característica pode ser atribuída, em parte, a fatores patogênicos específicos, incluindo fatores relacionados a aderência (MOHAMED *et al*, 2004).

Os fatores de adesão mais importantes são substância de agregação (Asa), proteína de superfície extracelular (*Esp*), antígeno de *E. faecalis* A (*EfaA*), adesina de colágeno de *E. faecalis* (*Ace*) e Ebp (endocardite e pili associado ao biofilme) (FISHER; PHILLIPS, 2009) e fatores patogênicos secretados de enterococos com um valor na patogênese são CylA (citolisina), GeLE (gelatinase) e Hyl (hialuronidase) (KAYAOGLU; ØRSTAVIK, 2004). Diversos estudos investigaram o papel desses fatores de virulência na formação de biofilme por enterococos (SHANKAR *et al*, 1999; SHANKAR *et al*, 2001; DUPRE *et al*, 2003; SANDOE *et al*, 2003).

3.5 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Desde os anos 1960, as infecções enterocócicas nosocomiais tornaram-se preocupantes para saúde pública, pois as cepas isoladas demonstravam um perfil de resistência aos antibióticos (TYNE *et al*, 2013). Ao longo do tempo os *Enterococcus* vêm tornando-se uma das mais frequentes bactérias isoladas nos ambientes hospitalares e isso se deve, principalmente por apresentarem resistência intrínseca a diversos grupos de agentes antimicrobianos e a abundância de elementos móveis (plasmídeos e transposons) em *E. faecalis* que provavelmente contribuem para a acumulação de virulência e o surgimento de resistência a drogas (BØHLE *et al*, 2011).

3.5.1 Resistência Intrínseca

Uma das características marcantes dos enterococos é a sua resistência natural a diversos antibióticos utilizados rotineiramente na clínica contra cocos

Gram-positivos. Esta resistência está diretamente ligada a genes localizados no cromossoma. Isto leva esses micro-organismos a serem naturalmente resistente a β -lactâmicos, cefalosporinas, sulfonamidas, clidamicina e aminoglicosídeos (MURRAY, 1990).

A resistência aos β -lactâmicos está implicada com a superprodução da proteína de ligação à penicilina (PLP). *E. faecalis* pode adquirir maior resistência aos β -lactâmicos através da aquisição de β -lactamases oriunda de outras bactérias o que leva a obter Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) maiores para essa droga quando comparados a outros organismos Gram-positivos (WOODFORD; LIVERMORE, 2009; HOLLENBECK; RICE, 2012).

Os aminoglicosídeos atuam pela inibição da síntese de proteínas ribossomal e é a sua incapacidade de entrar na bactéria que lhe confere a baixa atividade em baixas concentrações da droga (HOLLENBECK; RICE, 2012).

3.5.2 Resistência adquirida

No tratamento de infecções enterocócicas a terapia de escolha é feita frequentemente através do uso de vancomicina e em casos de graves infecções, através da combinação sinérgica de agentes ativos na parede celular (glicopeptídeos, principalmente vancomicina, e beta-lactâmicos) com aminoglicosídeos (geralmente, gentamicina) (ARIAS *et al*, 2007; WOODFORD; LIVERMORE, 2009).

Entretanto, o que gera grande preocupação é o fato de que os *E. faecalis* também possuem a capacidade de adquirir rápida resistência através de genes localizados em plasmídeos, transposons e através de troca cromossômica e mutações, levando a um grande desafio para medidas terapêuticas e se tornando a mais importante forma de patogenia da espécie (RATHNAYAKE *et al*, 2011; TREMBLAY; ARCHAMBAULT, 2013).

Os genes de resistência a drogas constituem mais de 25% dos elementos móveis, refletindo assim uma acumulação desenfreada de elementos de resistência de drogas e fatores de virulência (TYNE *et al*, 2013). Por estarem presentes no trato gastrointestinal, aumentam a possibilidade de receberem genes de resistência de outros micro-organismos, podendo posteriormente ser reservatórios de tais genes para outras bactérias mais patogênicas (HEGSTAD *et al*, 2010).

Através da cadeia alimentar, enterococos resistentes a antimicrobianos também podem transmitidos aos seres humanos através do gado e produtos alimentares derivados (JAMET *et al*, 2012).

Primeiros relatos na Europa em 1987, cepas de enterococos resistentes à vancomicina (ERV) têm recebido atenção crescente desde o final dos anos 1980, quando um rápido aumento nos números de infecções nosocomiais foi relatado nos Estados Unidos. Dos sete fenótipos (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG e VanL) associados à resistência a Vancomicina, os fenótipos VanA e VanB são os mais clinicamente relevantes, devido à capacidade de transferência genética entre espécies e gêneros e por provocarem alto grau de resistência à droga, sendo ambos mais encontrados em *E. faecalis*. A teicoplanina é outro fármaco glicopeptídeo que exibe muitas semelhanças com a Vancomicina, onde os enterococos VanA são resistentes à teicoplanina e os fenótipos VanB e VanC são suscetíveis a este fármaco (FURTADO *et al*, 2006 2011; BATISTÃO *et al*, 2012).

Em aminoglicosídeos temos como exemplo o principal mecanismo de resistência a gentamicina, que ocorre mais frequentemente através da aquisição de um gene (APH(2'')-Ia-AAC(6')-Ie) que modifica a gentamicina, tornando não mais capaz de se ligar ao seu alvo na subunidade ribossômica 30S e assim perdendo sua atividade antibacteriana (HOLLENBECK; RICE, 2012).

A partir do ano 2000, cepas ERV se mostravam sensíveis para o tratamento mais recente, através do inibidor de síntese proteica, Linezolida. Quadro este que já vem mudando com a descoberta cada vez mais de cepas resistentes a essa droga (KAINER *et al*, 2007; UPADHYAYA, RAVIKUMAR; UMAPATHY, 2009).

Resistência ao cloranfenicol, eritromicina, níveis elevados de clindamicina, tetraciclina e fluoroquinolonas são também exemplos de resistência adquirida por esses micro-organismos (RATHNAYAKE *et al*, 2011).

Cada vez mais a literatura descreve casos de cepas multirresistente as principais formas de tratamento aumentando a taxa de mortalidade em unidades de terapia intensiva, fazendo-se, assim, urgente a descobertas de novas drogas contra essas graves infecções (LOURENÇO *et al*, 2011).

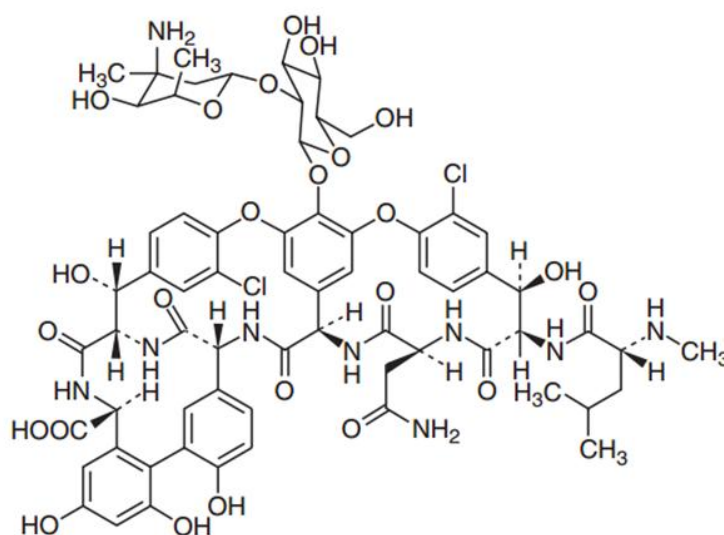
3.6 ANTIMICROBIANOS AVALIADOS

3.6.1 Glicopeptídeos

Glicopeptídeos são constituídos por grandes estruturas cíclicas complexas, contendo em sua molécula aminoácidos e açúcares. Em consequência de sua conformação molecular, estes antibióticos são resistentes à ação de enzimas proteolíticas, como as beta-lactamases. Um dos principais representantes desta classe é a vancomicina (figura 4), que tem uma estrutura tricíclica (VON NUSSBAUM *et al*, 2006).

A vancomicina foi o primeiro antimicrobiano da classe desenvolvido para uso clínico. Foi obtida através de culturas de *Amycolatopsis orientalis*. Exerce atividade contra estafilococos, enterococos, estreptococos, *Clostridium difficile* e outras bactérias anaeróbias gram-positivas, como *Peptostreptococcus*. Sua atividade bactericida contra estreptococos e estafilococos é possível com menores concentrações da droga. Já contra enterococos, apesar de ativa, não produz efeito bactericida. Desta forma, para tratamento de infecções por este agente é recomendado o uso sinérgico de um aminoglicosídeo.

Figura 4 – Estrutura química da vancomicina



Fonte: GUIMARÃES *et al*, 2010.

A vancomicina apresenta uma conformação rígida importante para a atividade. Os glicopeptídeos inibem a biossíntese da parede celular bacteriana pela

complexação com o resíduo dipeptídico terminal D-Ala-D-Ala das cadeias peptídicas que constituem a parede celular. Esta complexação impede que o substrato esteja disponível para a ação da transpeptidase inibindo, portanto, a reação de transpeptidação (PACE; YANG, 2006).

Nos micro-organismos em reprodução, a vancomicina atua durante a formação de nova parede celular, os glicopeptídeos ligam-se e formam complexos com as unidades N-acetilglicosamina e N-acetilmurâmico-peptídeo, que iriam compor o peptidoglicano da nova parede. Desta maneira, interrompem o processo de polimerização da parede celular. Desprovidas de parede celular, as bactérias sofrem lise, devido à elevada pressão osmótica do seu meio interno. É importante observar que, apesar do processo ser diferente, o resultado é similar ao ocorrido com a administração de antibióticos β -lactâmicos (PACE; YANG, 2006).

O mecanismo de resistência aos glicopeptídeos envolve uma menor afinidade destas drogas aos precursores de peptidoglicano das bactérias, permitindo a síntese desta estrutura da parede celular apesar da exposição ao antimicrobiano (WALSH, 2003). Diferentes fenótipos de resistência ao glicopeptídeo foram descritos em *Enterococcus*, os fenótipos *VanA* e *VanB* são os mais frequentes (FISHER; PHILLIPS, 2009). No entanto, o fenótipo *VanA* é o mais amplamente disseminado e está associado a surtos nosocomiais em instituições de saúde (MUNDY *et al*, 2000; PEROZO MENA *et al*, 2011).

Entre os genótipos de resistência aglicopeptídeos como vancomicina, é importante diferenciar aqueles que são adquiridos e transferíveis (*VanA* e *VanB*) dos intrínsecos e intransferíveis (*VanC*, *VanD*, *VanE* e *VanG*). Os genótipos adquiridos têm altos níveis de resistência e, portanto, são os que foram implicados na maioria dos surtos hospitalares, portanto, sua presença implica medidas rápidas de controle. A importância clínica e epidemiológica daqueles com resistência intrínseca é menos clara, tanto por apresentarem níveis baixos ou intermediários de resistência à vancomicina quanto por até agora não estarem envolvidos em surtos, embora possam causar infecções graves (TOYE *et al*, 1997; PEROZO MENA *et al*, 2011).

3.6.2 β -Lactâmicos

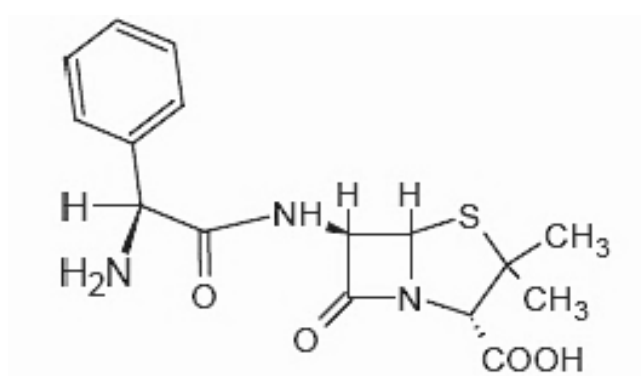
Os β -lactâmicos se caracterizam pela presença, em sua estrutura química, do anel β -lactâmico, responsável pela sua ação antimicrobiana. A ligação do anel β -

lactâmico com outros diferentes anéis, como anel tiazolidínico, nas penicilinas, ou o anel di-hidrotiazina, nas cefalosporinas, compõem as estruturas básicas que caracterizam as diferentes classes de antibióticos beta-lactâmicos (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

Dentre os β -lactâmicos, as aminopenicilinas (penicilinas semissintéticas) se destacam por apresentarem um amplo espectro de atividade que se estende aos Gram-negativos, e por apresentarem efeitos adversos menos frequentes. Ampicilina (figura 5) e amoxicilina são os representantes deste grupo (WALSH, 2003; SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

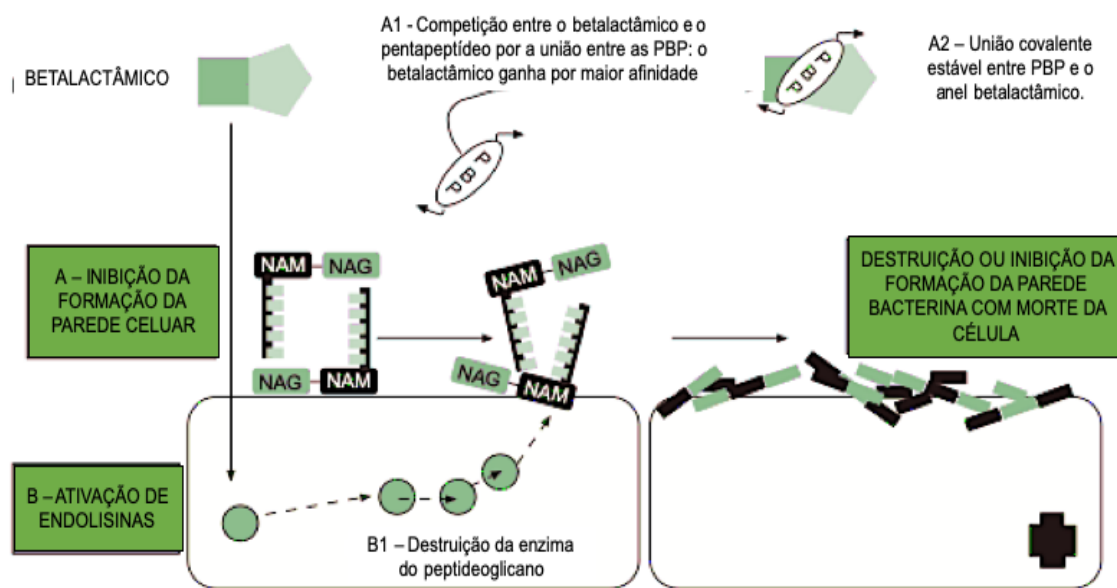
São antimicrobianos bactericidas, que inibem a síntese da parede celular através da interrupção do processo de transpeptidação (Figura 6). Esse mecanismo baseia-se na união de β -lactâmicos a receptores específicos localizados na superfície interior da membrana celular bacteriana, denominados “proteínas fixadoras de penicilina” (PBPs). As PBPs possuem um papel chave nas fases finais da síntese de peptidoglicano, estas proteínas catalisam a ligação cruzada das subunidades da parede celular. Para a sua atuação, os β -lactâmicos devem primeiramente penetrar na parede celular bacteriana (SUÁREZ; GUDIOL, 2009; URBINA-DAZA *et al*, 2019).

Figura 5 – Estrutura química da Ampicilina



Fonte: PETRI JUNIOR, 2006.

Figura 6 – Ação dos β -lactâmicos na parede celular bacteriana



NAM: Ácido N-acetilmurâmico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein

Fonte: Adaptado de SUÁREZ; GUDIOL, 2009.

As bactérias podem desenvolver resistência aos antibióticos β -lactâmicos através dos seguintes mecanismos: prevenção da interação entre o antibiótico e a PBP alvo; incapacidade do antibiótico de se ligar à PBP; hidrólise do antibiótico por β -lactamases. A atividade das β -lactamases constitui o principal mecanismo de resistência das bactérias aos antibióticos β -lactâmicos (ZAPUN *et al*, 2008; URBINA-DAZA *et al*, 2019).

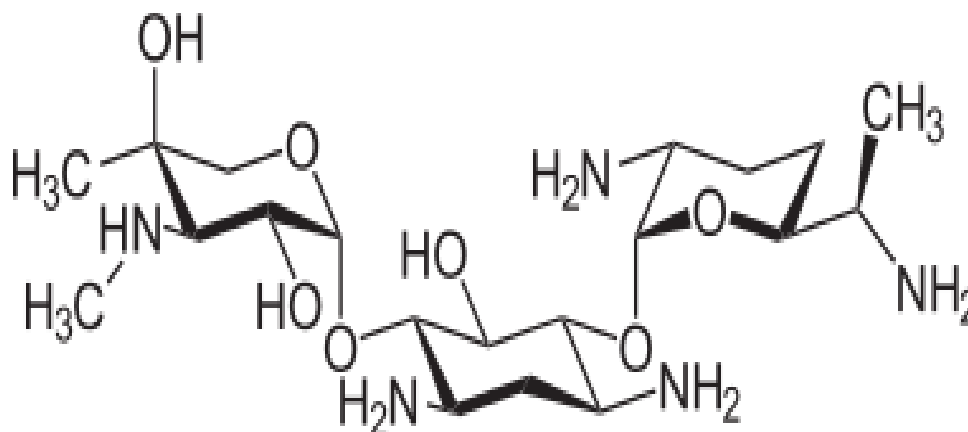
A síntese de β -lactamases é induzida tanto pela presença de moléculas do antibiótico quanto pela presença de precursores da parede celular do meio extracelular. A atividade dessas enzimas está dirigida especificamente à hidrólise de um anel β -lactâmico, provocando a produção de um composto ácido desprovido de atividade antibacteriana (NAGANO *et al*, 1999).

3.6.3 Aminoglicosídeos

O primeiro aminoglicosídeo – a estreptomicina – foi isolado em 1940 a partir de culturas de *Streptomyces griseus* e foi o segundo antibiótico usado na terapêutica, logo após o aparecimento da penicilina, nomeadamente para o tratamento da tuberculose. São moléculas hidrofílicas, constituídas por um anel aminociclitol,

derivado do inositol, ligado a um ou mais açúcares aminados, através de ligações glicosídicas. Dentre os aminoglicosídeos prescritos na prática clínica, destaca-se a gentamicina, conforme figura 7 (DURANTE-MANGONI *et al*, 2009).

Figura 7 – Estrutura química da gentamicina



Fonte: Sigma-Aldrich, 2019

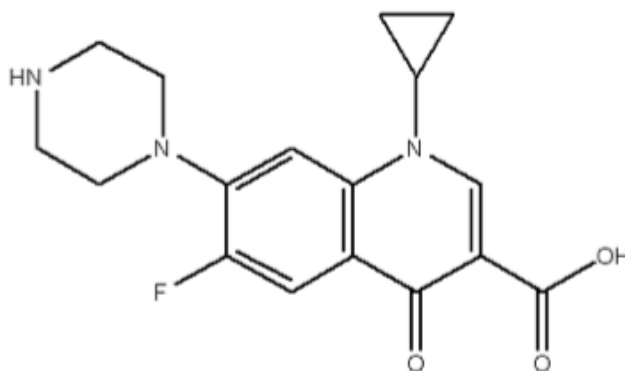
Aminoglicosídeos são drogas bactericidas, que agem ao se ligar ao ribossomo bacteriano, inibindo irreversivelmente a síntese protéica (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003). O seu mecanismo bactericida se deve à sua natureza policatiónica. Por molécula existem cerca de 3 a 6 grupos amino protonados, bem como à existência de grupos hidroxilos. Tais características permitem a interação destes antibióticos com o rRNA 16S da subunidade 30S do ribossomo através de pontes de hidrogênio e de ligações iônicas, causando alinhamentos estéricos no rRNA e interferindo com a síntese normal de proteínas (MINGEOT-LECLERCQ *et al*, 1999; DURANTE-MANGONI *et al*, 2009). A resistência aos aminoglicosídeos é causada por meio de três mecanismos: impermeabilidade da parede bacteriana; alteração molecular no ponto de ligação do antibiótico ao ribossomo; inativação enzimática, neste caso, mediada por meio de plasmídeos (DOI; ARAKAWA, 2007).

3.6.4 Fluorquinolonas

São antimicrobianos obtidos inicialmente no início da década de 1960, obtidos a partir da síntese da cloroquina – ácido nalidíxico. A partir de 1980 com a junção de novos componentes, com a incorporação de um átomo de flúor e de um anel piperazínico a molécula, que modificaram significativamente o perfil farmacocinético

e o espectro de atividade. Atualmente são classificadas em gerações. O ciprofloxacino observado na figura 8 é classificado como uma fluoquinolona de terceira geração (APPELBAUM; HUNTER, 2000; DRLICA *et al*, 2008).

Figura 8 – Estrutura química do ciprofloxacino



Fonte: GUIMARÃES *et al*, 2010.

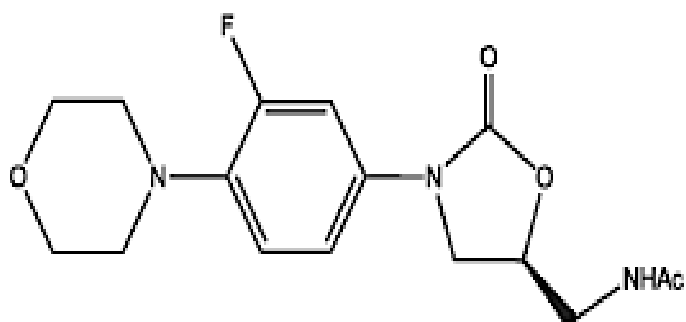
Fluorquinolonas são antimicrobianos bactericidas que atuam sobre o processo de replicação cromossômica bacteriana. Seus alvos são as enzimas topoisomerase II (DNA-girase) e topoisomerase IV, que controlam o processo de duplicação do material genético. Em consequência da ação das quinolonas, a cadeia de DNA torna-se anormalmente longa, não cabendo dentro da célula bacteriana, que pode sofrer uma ruptura. Em algumas bactérias, a DNA-girase funciona como alvo primário, em outras situações o alvo preferencial é a topoisomerase IV, no entanto, em ambas as situações a outra enzima se torna o alvo secundário (ALÓS, 2003).

A resistência a fluorquinolonas ocorre por mutação genética, na maioria dos casos, e raramente é mediada por plasmídeos. A resistência manifesta-se por meio de três mecanismos: por alteração nas enzimas topoisomerases II e IV, que se tornaram resistentes a ação da droga; a alteração na permeabilidade à droga pela membrana celular bacteriana, que impede a passagem da droga pelos canais porínicos; ativação de bombas de efluxos, por alguns micro-organismos, retirando a droga do interior da célula bacteriana (HOOPER, 2001; DRLICA *et al*, 2008).

3.6.5 Oxazolidinonas

Classe de antimicrobianos que surgiu em 1999, com a obtenção da linezolida, (figura 9), por meio de síntese química, caracterizada pela presença do anel oxazolidinona. Linezolida é um antimicrobiano bacteriostático que atua na inibição da síntese proteica no estágio inicial, por união ao sítio 23S do rRNA bacteriano especificamente sobre a subunidade 50S do ribossomo, impedindo a formação do complexo 70S, componente essencial no processo da síntese (MEKA *et al*, 2004). O desenvolvimento de resistência à linezolida é resultado de uma mutação no gene 23S rRNA, que altera o RNA ribossômico, impedindo a ligação do antibiótico ao ribossomo (BOZDOGAN; APPELBAUM, 2004; BI *et al*, 2018).

Figura 9 – Estrutura química da linezolida



Fonte: GUIMARÃES *et al*, 2010.

3.7 NAFTOQUINONAS

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural. Nos últimos anos intensificou-se o interesse nestas substâncias, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos. Na natureza, estão envolvidas em etapas importantes do ciclo de vida de seres vivos, principalmente nos níveis da cadeia respiratória e da fotossíntese (FALKENBERG, 2010).

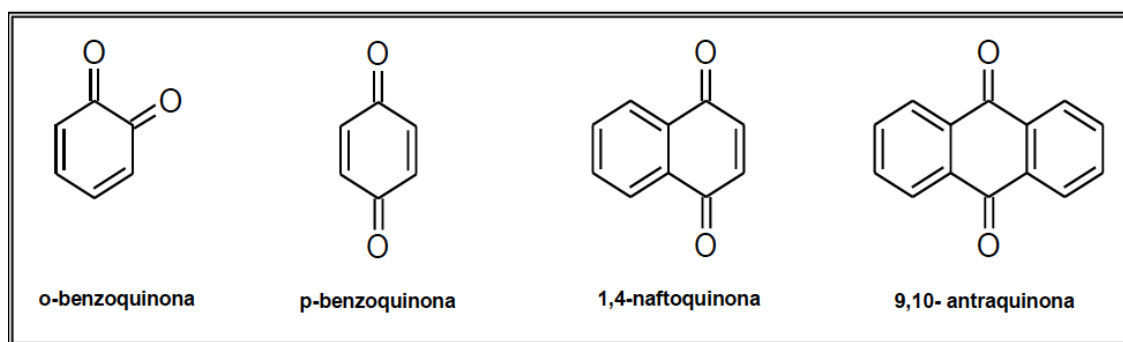
Em estudos farmacológicos, as quinonas mostram variadas bioatividades, destacando-se, dentre muitas, as propriedades microbicidas, tripanossomicidas,

viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas (SILVA *et al*, 2003).

A unidade quinoide (1,4-dicetociclohexa-2,5-dieno ou 1,2-dicetociclohexa-3,5-dieno) ocorre com relativa abundância em substâncias de origem biológica. A nomenclatura de quinonas é definida pelo esqueleto do anel aromático, estabelecendo-se as posições dos dois grupos carbonílicos na molécula (1,2- ou *orto*-, 1,4- ou *para*-) e acrescentando-se o sufixo quinona (VAN DER VIJVER, 1975).

Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos (mostrado na figura 10) utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídica: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas – um anel naftalênico; antraquinonas – um anel antracênico linear ou angular (SILVA *et al*, 2003).

Figura 10 – Classificação das quinonas



Fonte: Adaptado de SIMÕES *et al*, 2007.

As naftoquinonas são compostos orgânicos altamente reativos que pertencem ao grupo de compostos carbonílicos α,β -insaturados que tem como característica estrutural a posição dos grupos carbonílicos nas posições 1,4 ou com menor frequência 1,2 no anel naftalênico. Na natureza se apresentam com grupo hidroxílico e/ou metílico como substituintes, no entanto, podem ser encontradas na forma livre ou condensada com diversos monossacarídeos (LÓPEZ *et al*, 2011).

Conhecido desde 1858 (ARNAUDON, 1858), o lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona), destaca-se dentre as naftoquinonas naturais. Pode ser facilmente extraído da madeira de plantas dos gêneros *Tabebuia* sp. e *Tecoma* sp. (bignoniaceas) conhecidas como ipê (GIBBS, 1974; LINARD *et al*, 1975; MATA-SANTOS *et al*, 2015). O principal interesse no lapachol deve-se a capacidade de

induzir o estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e ânion-radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($\text{HO}^{\cdot}$). Estas espécies podem causar danos em componentes celulares, que podem alterar o balanço natural de sinais que interferem na divisão celular em pontos específicos da evolução morfogênica natural ou levar a célula a induzir apoptose (BELIZÁRIO, 2002).

Estudos realizados indicam que a ocorrência da indução do estresse oxidativo pelo lapachol ocorre a nível da enzima P450 redutase. Neste processo as espécies reativas do oxigênio promovem a cisão do DNA. Neste caso, esta via oxidativa é um mecanismo de ação importante, pois os micro-organismos são mais suscetíveis que os hospedeiros (SILVA *et al*, 2003; MOURA *et al*, 2012).

O estresse oxidativo, sobre os seres vivos, pode resultar da ação de muitos agentes ambientais, como radiações gama e ultravioleta, ozônio e poluentes automotivos no ar, assim como de certas substâncias da cadeia alimentar e de derivados do tabagismo. Estima-se que de 1 a 2% do oxigênio consumido pelos mamíferos sejam convertidos a espécies oxidantes, devido falhas fisiológicas na mitocôndria (GRACY *et al*, 1999; SILVA *et al*, 2003).

O ciclo redox das quinonas onde o substrato quinonoídico (Q) sofre biorredução por um ou dois elétrons, catalisada pelas enzimas NADPH, dentre outras, forma o ânion radical semiquinona ($\text{Q}^{\cdot-}$) *in situ*. Na presença de oxigênio molecular (O_2), esse ânion radical ($\text{Q}^{\cdot-}$) transfere um elétron e gera o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). O radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) sofre a ação da enzima superóxido desmutase gerando peróxido de hidrogênio, e paralelamente uma reação de Fenton catalisada por Fe^{+2} que produz o radical hidroxila (FERREIRA *et al*, 2010).

Tanto as espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio, são tóxicos para células alterando processos celulares básicos como a biossíntese de ácidos nucleicos e os mecanismos responsáveis pela biossíntese de energia em forma de ATP como a peroxidação de lipídeos e a alteração do transporte eletrônico com inibição da respiração celular (SILVA *et al*, 2003).

Outros mecanismos de ação relacionados com a toxicidade das naftoquinonas e derivados são baseados nos substituintes do anel farmacóforo de 1,4-naftoquinona, interagindo com a membrana celular microbiana, em função da lipofília dos substituintes, bem com ácidos nucleicos mediante a intercalação da parte 1,4-naftoquinonas entre os pares de bases da dupla hélice do DNA com

consequente inibição da replicação e transcrição, ambos os processos envolvidos em funções determinantes na viabilidade celular tal como a divisão e expressão dos genes (LÓPEZ *et al*, 2011).

Uma série de processos de importância crucial para as células, como a indução da morte por apoptose e os danos provocados pelo estresse oxidativo estão entre os principais efeitos que as quinonas provocam em sistemas biológicos. Sendo, as espécies O_2 e H_2O_2 estão sendo consideradas como dois importantes sinais reguladores de condições intracelulares (SALMON-CHEMIN *et al*, 2001).

Atualmente há uma reorientação da investigação por novos agentes capazes de inibir micro-organismos multidroga resistentes. Os compostos químicos naturais e seus derivados se propõem como uma alternativa além de apresentarem uma menor incidência de reações adversas quando comparados com fármacos sintéticos (LÓPEZ *et al*, 2011).

3.8 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) são técnicas realizadas *in vitro*, que têm sido os parâmetros mais usados para quantificar a atividade de uma droga frente a um micro-organismo, além de serem medidas convencionalmente utilizadas para ajudar na seleção de drogas para uso clínico (CRAIG, 1995; LI, 2000).

A CIM é definida como a menor concentração da droga, que não permite o desenvolvimento microbiano visível de inóculos padronizados, após serem expostos a uma série de diluições da droga e incubados por 24 horas a 37 °C em caldo; enquanto a CBM é a menor concentração da droga, que provoca uma diluição de 99,99% de bactérias viáveis, em comparação com o inóculo inicial não submetido ao antibiótico, nas mesmas condições experimentais estabelecidas para a determinação da CIM (COURVALIN, 1985; CRAIG, 1995; LI, 2000).

3.8.1 Associações de drogas

Na terapêutica clínica, a combinação de drogas é frequentemente utilizada no tratamento de infecções graves. Assim, as circunstâncias essenciais que motivam a utilização de uma associação de drogas na terapia são: tratamento de infecção

grave na diagnosticada, infecção polimicrobiana; o risco de seleção de mutantes resistentes; aumento do efeito bactericida; diminuição da toxicidade de drogas (COURVALIN, 1985; KROGSTAD; MOELLERING, 1986; RICE; ELIOPOULOS, 1989).

A razão para a terapia combinada é diminuir a possibilidade que um micro-organismo resistente possa emergir no tratamento com um agente antimicrobiano (TALLARIDA, 2011; DRAGO *et al*, 2007).

Quando usada na literatura de doenças infecciosas, a sinergia é definida como uma interação de dois ou mais antimicrobianos agentes em que o efeito produzido pela combinação é maior do que a soma de seus efeitos individuais quando usados sozinhos.

Quando o efeito da associação de drogas antimicrobianas é igual à soma de seus efeitos independentes quando medidos separadamente, isso é chamado de aditivo. Falta de qualquer efeito com a adição de um segundo medicamento é denominado indiferença. Da mesma forma, o antagonismo é dito quando o combinado efeito de drogas antimicrobianas é menor do que a soma dos efeitos independentes quando medidos separadamente (ELIOPOULOS; MOELLERING, 1996).

Vários métodos estão disponíveis para testar combinações de antimicrobianos e cada um tem sua própria definição de sinergia, indiferença ou antagonismo. O “*Checkerboard*” (método do tabuleiro de xadrez) e o “*Time Kill Curve*” (cinética de morte) um método de avaliação da sinergia entre agentes antimicrobianos bem estudados (JACKSON *et al*, 2009).

3.8.2 *Checkerboard* - Método do tabuleiro de xadrez

O *Checkerboard* é uma técnica realizada microdiluição em caldo em placas de 96 poços com diversas concentrações de antimicrobianos combinados. Após a inoculação do micro-organismo (inóculo de concentração definida) nos poços com antimicrobianos, a placa é incubada por 24h. As mesmas definições de sinergismo, adição, indiferença e antagonismo são aplicadas (ELIOPOULOS; MOELLERING, 1996; LEBER, 2016).

Uma variação do *Checkerboard*, representando uma expressão matemática do isoblograma, é a concentração inibitória fracionada (CIF). O método CIF envolve

determinar o CIM de cada antimicrobiano individual contra o micro-organismo, seguido pelo teste dos antimicrobianos sem combinação. A CIM, que em combinação inibe o micro-organismo, é então dividida pelo CIM apenas do antimicrobiano, produzindo uma CIF. A soma dos CIFs para a combinação é o índice CIF (ICIF) (HALL *et al*, 1983).

Uma desvantagem do método do tabuleiro de xadrez é que mede apenas a atividade inibitória dos antimicrobianos e suas associações. Em algumas situações clínicas, a quantificação da morte bacteriana não é relevante.

3.8.3 *Time Kill Curve* – Cinética de morte

A avaliação *in vitro* do efeito das associações é realizada utilizando o método do *Time Kill*, onde a dinâmica da atividade bactericida das drogas e suas associações são acompanhadas por um determinado período de tempo. A construção de curvas de cinética de morte pode ser usada para determinar a atividade bactericida de combinações antimicrobianas. Micro-organismos são incubados em caldo contendo várias concentrações dos antimicrobianos selecionados, isoladamente e em combinação (PILLAI *et al*, 2005; MENEZES *et al*, 2019).

Os dados são interpretados, comparando-se os resultados obtidos da associação com a droga mais ativa. A associação é classificada como sinérgica, antagônica, indiferente ou aditiva. Sinergismo é definido como um aumento de ≥ 100 vezes do número de morte microbiana em um período de 24 horas, comparado com o efeito da droga mais ativa; o antagonismo como uma diminuição de ≥ 100 vezes no número de morte bacteriana em 24 horas; efeito indiferente ocorre quando a variação é inferior a 10 vezes, aumento ou diminuição, no número de mortes em 24 horas; e o efeito aditivo ocorre, quando o resultado da associação é igual à soma dos efeitos de cada antibiótico estudado isoladamente na mesma concentração (KROGSTAD; MOELLERING, 1986; RICE; ELIOPOULOS, 1989).

No entanto, esses parâmetros fornecem um único ponto de observação durante o tempo exposição dos micro-organismos as concentrações estáveis de CIM e CBM. Que não informa as mudanças ocorridas no decorrer do tempo na quantidade de células bacterianas viáveis, além de não fornecer dados sobre a sequência de eventos. Dessa forma, é considerado um processo falho para avaliar o

início da ação bactericida, bem como os efeitos da mudança na concentração do inóculo e mudanças da concentração da droga sobre os eventos antibacterianos (LI, 2000).

Essas informações adicionais são fornecidas pelo estabelecimento da curva de morte *versus* tempo, que avalia *in vitro* o andamento e extensão da ação bactericida, realizando subculturas quantitativas em intervalos de tempo regulares, após a exposição do micro-organismo a concentrações farmacológicas da droga e suas associações (BARRY *et al*, 1999).

Uma curva de morte *versus* tempo é gerada pela exposição do organismo teste a concentrações constantes do antibiótico, consiste em uma fase *lag*, uma fase *log*, e uma fase de recrescimento. A fase *lag* representa o tempo requerido para a penetração do antimicrobiano dentro da célula; a fase *log* é considerada como medida quantitativa para a intensidade do efeito bactericida; a fase de recrescimento reflete a habilidade dos micro-organismos, para adaptar-se ao ataque da droga nem sempre representado (CRAIG, 1995; LI, 2000).

4 MÉTODOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

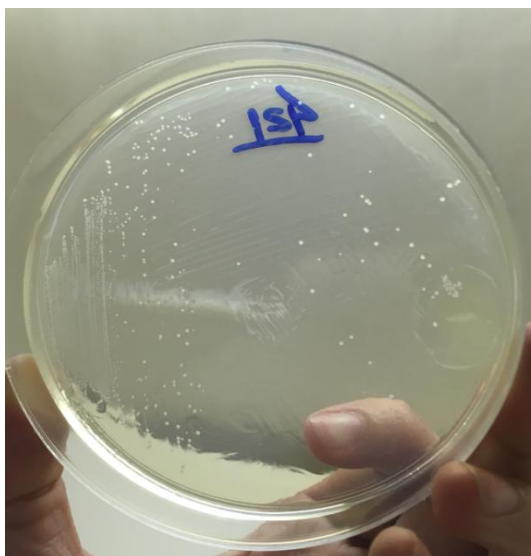
4.1.1 Micro-organismos

Foi utilizado neste estudo um grupo composto por 12 cepas de *Enterococcus faecalis* o qual compreende: 2 cepas de referência (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e 10 cepas clínicas (LFBM 421, LFBM 335, LFBM 918, LFBM 240, LFBM 417, LFBM 168, LFBM 671, LFBM189, LFBM 160 e LFBM 272).

4.1.2 Isolamento

As cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* foram isoladas de amostras de sangue (hemoculturas) oriundas de pacientes hospitalizados. Os *Enterococcus* foram reativados em caldo Mueller-Hinton e semeadas em ágar Mueller-Hinton (AMH) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) e incubadas a 37°C durante 24 horas, conforme figura 11. Esses micro-organismos são mantidos no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos (LFBM) do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Figura 11 – Semeio de *Enterococcus faecalis* em MH



Fonte: O autor.

4.1.3 Identificação

A partir do crescimento das cepas em ágar Mueller-Hinton, foram realizadas uma série de avaliações para identificação, a saber: a) Exame microscópico: foi realizado para observação das características morfo-tintoriais em esfregaços corados pelo Gram. b) Identificação bioquímica: a partir de uma cultura pura em AMH testes bioquímicos foram realizados para identificação do gênero e da espécie.

Desta forma, foram realizados os seguintes testes: Produção da catalase, tolerância ao NaCl a 6,5%, prova da pirrolidonil arilamidase (PYR), hidrólise da esculina na presença de bile, fermentação do sorbitol, crescimento em telurito de potássio e hemólise em ágar sangue (KONEMANN, 2009).

4.1.3.1 Teste da catalase

A produção da enzima catalase foi detectada pela visualização da formação de bolhas (figura 12) após o contato de uma porção do material fresco (duas a três colônias) depositada em uma lâmina de vidro, com duas gotas de uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio.

Figura 12 – Identificação da produção da enzima catalase



Fonte: KONEMANN, 2009.

4.1.3.2 Tolerância ao NaCl a 6,5%

As amostras foram semeadas em caldo nutriente (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) suplementado com NaCl (6,5%). Assim, os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada por semeio em AMH após o período de incubação.

4.1.3.3 Hidrólise da L-pirroglutamil- β -naftilamida (teste de PYR)

O teste foi realizado através da utilização de um Kit de origem comercial BBL PYR (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) para determinação da capacidade de produção da pirrolidonil peptidase (PYRase). A atividade da pirrolidonase foi avaliada pela hidrólise da piroglutamil- β -naftilamida (*L*-pirrolidona- β -naftilamida [PYR]) em *L*-pirrolidona e β -naftilamina. O quadrante contendo o PYR foi umedecido com água destilada esterilizada. Com o auxílio de uma alça, um esfregaço foi realizado utilizando duas a três colônias. Em seguida, após 5 minutos a temperatura ambiente, 20 μ L do PYR reagente (*p*-dimetil-aminocinamaldeído a 0,015%) foi adicionado. O desenvolvimento de uma cor vermelha indicou reação positiva para o PYR, que é visualizada em até 2 minutos.

4.1.3.4 Hidrólise de esculina na presença de bile

Tubos contendo ágar bile-esculina (Laborclin, Brasil) foram inoculados com estrias superficiais e incubados a 37 °C, por 24 horas. Bactérias capazes de crescer em bile e hidrolisar esculina produzem glicose e resultando em um complexo castanho-escuro ou preto. A ocorrência de hidrólise da esculina na presença de bile (40%) foi considerada quando houve o escurecimento do meio, o que revela a precipitação de esculetina (7,7-diidroxycumarina) na presença de íons férricos.

4.1.3.5 Assimilação de carboidratos

Provas de utilização de carboidratos são amplamente empregadas para identificação de micro-organismos. O método de assimilação de carboidratos por discos baseia-se na utilização de uma base nitrogenada livre de carboidratos e na observação da presença ou não de crescimento ao redor de discos de papel de filtro impregnados com carboidratos. Púrpura de bromocresol foi utilizado como indicador no preparo do meio. Culturas jovens, de 18 horas de incubação, foram utilizadas para o teste. O semeio foi realizado em toda superfície do meio de cultivo com auxílio de *swab* e, posteriormente adicionado um disco (Merck, Alemanha) contendo sorbitol, proporcionando em uma concentração final de 1%. A leitura foi realizada após 48 horas de incubação a 37 °C. A presença de crescimento ao redor de um disco indica a assimilação do carboidrato pelo micro-organismo.

4.1.3.6 Ágar telurito de potássio (K₂TeO₃)

A seletividade deste meio consiste na presença do telurito de potássio, que inibe uma grande parte dos micro-organismos, no caso do gênero *Enterococcus* é uma prova utilizada na diferenciação de espécies e que se baseia na capacidade das espécies em reduzir telurito potássio em telurito metálico, essa redução é visualizada pelo crescimento de colônias enegrecidas no meio. Dentre o gênero *Enterococcus*, a espécie *E. faecalis* é positiva para esta prova.

4.1.3.7 Atividade hemolítica

A produção de hemolisina foi avaliada em ágar sangue (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA), suplementado com 5% de sangue humano). Os micro-organismos foram semeados na superfície do ágar sangue, e incubadas a 37 °C por 24 horas. A atividade hemolítica foi observada pela formação de zonas claras ao redor das estrias/colônias, os *Enterococcus* podem ser classificadas como α e β -hemolíticos ou não produtores de hemólise.

4.1.4 Conservação

A preservação dos micro-organismos foi realizada a partir de uma colônia semeada em frascos de penicilina contendo ágar Mueller-Hinton inclinado. Os tubos foram incubados a 37 °C por 48 horas. Após o período de incubação, para cada micro-organismo foi adicionado cerca de 1 mL de óleo mineral (Vetec, Brasil) esterilizado. Os frascos foram selados com anel de alumínio e mantidos sob refrigeração a 4 °C.

4.1.5 Determinação do Fenótipo de Resistência

As cepas de *E. faecalis* tiveram seu fenótipo de resistência determinado através do método de disco difusão (BAUER *et al*, 1966) que classifica os micro-organismos em sensíveis, resistentes ou intermediários com base no diâmetro da zona de inibição do micro-organismo em torno do disco. Os antimicrobianos e os critérios de interpretação determinados foram utilizados nesse estudo pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) que estão descritos na tabela 1:

Tabela 1 – Antimicrobianos e critérios de classificação da resistência*

Antibiótico	Concentração	Critérios
		Diâmetro da zona de inibição (mm)
Vancomicina (VAN)	30 µg	R ≤ 14
Gentamicina (GET)	10 µg	R ≤ 15
Estreptomicina (EST)	10 µg	R ≤ 17
Meropenem (MER)	10 µg	R ≤ 18
Ertapenem (ETP)	10 µg	R ≤ 14
Tigeciclina (TGC)	15 µg	R ≤ 15
Linezolida (LZD)	10 µg	R ≤ 19
Carbapenicilina (CAR)	100 µg	R ≤ 14

Fonte: **Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI e European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-EUCAST*

4.1.6 Determinação das Concentrações Inibitórias e Bactericidas Mínimas (CIM e CBM)

4.1.6.1 Padronização do Inóculo

O inóculo foi padronizado de acordo com o protocolo descrito no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016). Para realização dos testes, os micro-organismos foram cultivados em ágar Mueller-Hinton a 37°C, após 18-24 horas de incubação, colônias isoladas foram inoculadas em caldo Mueller-Hinton e a turbidez desta suspensão comparada ao tubo 0,5 da escala de *MacFarland*, equivalente a 10^8 UFC/mL. Em seguida, as suspensões bacterianas foram diluídas (1:10) sucessivamente em solução de NaCl (0,85% p/v) para a obtenção de um inóculo de concentração 10^5 UFC/mL.

4.1.6.2 Agentes antimicrobianos

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram utilizados os seguintes agentes antimicrobianos: Cloridrato de vancomicina, Ampicilina sódica, Cloridrato de ciprofloxacino, Sulfato de gentamicina e Linezolida. Também foram incluídos nesse estudo, o Lapachol, α -Lapachona e β -Lapachona.

O lapachol foi obtido por extração a partir da casca do caule do Ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*) e a α e β -Lapachona por síntese orgânica a partir do lapachol (LIMA, 1972)

Os antimicrobianos foram pesados analiticamente e solubilizados em água, de forma a obter uma solução estoque de concentração inicial 2048 μ g/mL. As naftoquinonas, após pesagem analítica, foram solubilizadas em um sistema composto por água/Tween 80/etanol (6:1:3), de forma a obter uma solução de 1280 μ g/mL. Estas soluções estoque foram esterilizadas por filtração em membrana Milipore® de 0,22 μ m de porosidade.

4.1.6.3 Determinação da Atividade Antimicrobiana

A determinação Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada utilizando o método de microdiluição, seguindo as recomendações estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2016) com pequenas modificações. Diluições seriadas das naftoquinonas e dos outros antimicrobianos foram preparadas separadamente em tubos contendo caldo Mueller-Hinton. Estas diluições variaram de 640 a 5 µg/mL para naftoquinonas e de 1024 a 0,5 µg/mL para os antimicrobianos. Para cada concentração obtida foram inoculados 100 µL em microplacas estéreis de 96 poços. Ao final, 100 µL da suspensão bacteriana, foram inoculadas em cada poço obtendo-se uma concentração final de 10^4 UFC.

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após este período foram adicionados em cada poço 40 µL da solução a 4 mg/mL de cloridrato de 2-(4-Iodofenil)-3-(4-Nitrofenil)-5-phenil tetrazólio – INT (Sigma-Aldrich Brasil Ltda). As placas foram novamente incubadas por 6 horas a 37°C. A viabilidade celular foi observada pelo aparecimento da cor violeta nos poços, através de uma redução de oxidação do INT com moléculas da parede celular bacteriana. Uma avaliação antimicrobiana do sistema solvente utilizado foi incluída neste estudo, para excluir possíveis efeitos tóxicos sobre os *Enterococcus*. A CIM foi considerada como a menor concentração dos antimicrobianos capazes de inibir o crescimento bacteriano após 24 h de incubação a 37°C.

A determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada segundo o método proposto por Courvalin (1985). Após a determinação da CIM, nos poços onde não foram visualizados crescimento, foram retiradas alíquotas de 0,01 mL e semeados em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. O valor da CBM foi definido como a menor concentração dos antimicrobianos capaz de inviabilizar 99,9% das células bacterianas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.1.6.4 Critérios de interpretação

O critério de resistência foi definido para cada agente antimicrobiano com base no que preconiza o *Clinical & Laboratory Standards Institute* descritos na tabela 2:

Tabela 2 – Critérios de interpretação dos valores de CIM

Antimicrobianos	Break Points*
Vancomicina	CIM $\geq$ 32 μ g/mL
Ampicilina	CIM $\geq$ 16 μ g/mL
Gentamicina	CIM $\geq$ 16 μ g/mL
Linezolida	CIM $\geq$ 8 μ g/mL
Ciprofloxacino	CIM $\geq$ 4 μ g/mL

Fonte: *CLSI, 2016

Para classificar a atividade anti-enterocócica destas naftoquinonas foram utilizados os mesmos critérios descritos por Pretto *et al* (2004). A atividade antimicrobiana é classificada como forte para CIM com valores inferiores a 100 μ g/mL, moderada para valores de CIM entre 100 – 500 μ g/mL e fraca atividade para valores entre 500 – 1000 μ g/mL. São considerados inativos valores de CIM superiores a 1000 μ g/mL.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-ENTEROCOCCICA DA β -LAPACHONA ASSOCIADA A ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAIS

4.2.1 Micro-organismos

Foram utilizadas 11 cepas clínicas para determinação da associação dos antibióticos. Dez cepas de origem hospitalar isoladas de hemoculturas (LFBM 421, LFBM 335, LFBM 918, LFBM 240, LFBM 417, LFBM 168, LFBM 671, LFBM 189, LFBM 160 e LFBM 272) e 1 cepa de referência (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299).

4.2.2 Agentes Antimicrobianos

Para avaliação da atividade anti-enterococcica das associações de antimicrobianos foram utilizados os seguintes agentes antimicrobianos: Cloridrato de vancomicina (Antibióticos do Brasil-ABL); Sulfato de gentamicina (Santisa); Ampicilina sódica (Ariston); Cloridrato de ciprofloxacina (Isofarma); β -Lapachona (Departamento de Antibióticos – UFPE. Recife, Brasil).

As drogas foram pesadas, analiticamente, e solubilizados de forma a obter uma solução estoque de concentração inicial 2048 µg/mL e 1280 µg/mL para os antimicrobianos e naftoquinonas, respectivamente. As naftoquinonas, após pesagem analítica, foram solubilizadas em um sistema composto por água/Tween 80/etanol (6:1:3), e os antimicrobianos em água destilada esterilizada. Estas soluções estoque foram esterilizadas por filtração em membrana de celulose de 0,22 µm de porosidade.

4.2.3 Padronização do Inóculo

O inóculo foi padronizado de acordo com o protocolo descrito no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016). Para realização dos testes, os micro-organismos foram cultivados em ágar Mueller-Hinton a 37°C, após 24 horas de incubação, colônias isoladas foram inoculadas em caldo Mueller-Hinton e a turbidez desta suspensão comparada ao tubo 0,5 da escala de *MacFarland*, equivalente a 10^8 UFC/mL. Em seguida, as suspensões bacterianas foram diluídas (1:10) sucessivamente em solução de NaCl (0,85%) para a obtenção de um inóculo de concentração 10^5 UFC/mL.

4.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana da associação da β-Lapachona a agentes antimicrobianos

A atividade antimicrobianas das associações entre β-lapachona e os antimicrobianos foi realizada pelo método do tabuleiro de xadrez (*Checkerboard*) (LORIAN, 1991). Diluições da β-lapachona e antimicrobianos foram realizadas em caldo Mueller-Hinton de modo a obter concentrações sub-inibitórias que variaram de 1/2 a 1/256 da CIM e de 1/2 a 1/512 da CIM para β-lapachona e antimicrobianos, respectivamente.

A partir destas diluições, 50 µL de cada concentração das drogas foram transferidos para os poços da microplaca. Os antimicrobianos foram distribuídos no sentido da coluna 1 (mais concentrado) a coluna 12 (menos concentrado). A β-lapachona, foi distribuída no sentido da linha H (mais concentrada) a linha A (menos concentrada). Para cada poço foram pipetados 100µL das suspensões bacterianas

(10^4 UFC/poço). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, conforme figura 13:

Figura 13 – Diagrama de distribuição dos antimicrobianos no método *Checkerboard*

	1/2 CIM	1/4 CIM	1/8 CIM	1/16 CIM	1/32 CIM	1/64 CIM	1/128 CIM	1/256 CIM	1/512 CIM	1/1024 CIM	1/2048 CIM	1/5096 CIM
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/256 CIM A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/128 CIM B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/64 CIM C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/32 CIM D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/16 CIM E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/8 CIM F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/4 CIM G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/2 CIM H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Fonte: O autor.

4.2.5 Critérios de interpretação

Os dados foram interpretados a partir dos valores do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) obtido pela seguinte equação:

$$ICIF = CIF_A + CFI_B$$

Onde: $CIF_A = \frac{\text{CIM } \beta\text{-Lapachona (A) em associação}}{\text{CIM } \beta\text{-Lapachona (A)}}$

$CIF_B = \frac{\text{CIM antimicrobiano (B) em associação}}{\text{CIM antimicrobiano (B)}}$

A partir dos valores de ICIF obtido nas associações foi possível classificar o tipo de interação entre a β -lapachona e antimicrobianos, observado na tabela 3:

Tabela 3 – Critérios de classificação dos valores de ICIF

FICI	Classificação das interações*
$ICIF \leq 0,5$	Sinérgico
$ICIF 0,5 - 1$	Aditivo
$1 \leq ICIF \leq 2$	Indiferente
$ICIF \geq 2$	Antagônico

Fonte: *Lorian, 1991

4.3 CINÉTICA DE MORTE DE *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 E ALTERAÇÕES ULTRA-ESTRUTURAIS APÓS EXPOSIÇÃO A β -LAPACHONA E VANCOMICINA

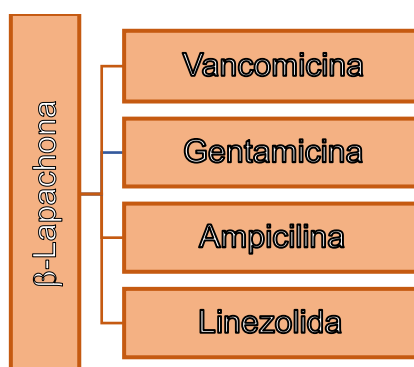
4.3.1 Micro-organismos

Para o estudo da cinética de morte e dos efeitos ultra-estruturais foi utilizada a cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 51229.

4.3.2 Agentes Antimicrobianos

Para avaliação da atividade bactericida das associações de antimicrobianos pelo método *Time Kill* foram utilizados os seguintes agentes antimicrobianos: Cloridrato de vancomicina (Antibióticos do Brasil – ABL); Sulfato de gentamicina (Santisa); Ampicilina sódica (Ariston); Linezolida (Pfizer); e β -Lapachona (Departamento de Antibióticos – UFPE. Recife, Brasil). Foram utilizadas, para determinação da cinética de morte, as seguintes associações em concentrações inibitórias e subinibitórias (CIM e 1/2 CIM), conforme figura 14:

Figura 14 – Diagrama das associações dos antimicrobianos



Fonte: O autor.

4.3.3 Meios de Cultura

Caldo Mueller-Hinton (BD) foi utilizado para cultivo, padronização do inóculo, determinação da atividade bactericida e o estudo das alterações ultra estruturais.

4.3.4 Padronização do inóculo

O inóculo foi padronizado de acordo com o protocolo descrito no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016). Para realização dos testes, o micro-organismo foi cultivado em AMH e incubado por 24 h a 37°C. Após incubação, colônias isoladas foram inoculadas em CMH até atingir uma turbidez equivalente a 10^8 UFC/mL. Em seguida, a suspensão bacteriana foi diluída (1:10) em CMH para a obtenção da concentração 10^6 UFC/mL.

4.3.5 Cinética de morte

O método “*Time Kill Curves*” para avaliar a morte bacteriana baseia-se na técnica que determina este parâmetro por enumeração das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), os sobreviventes de um inóculo previamente quantificado que foi exposto a concentrações conhecidas de drogas, em função do tempo (COURVALIN, 1985; KROGSTAD; MOELLERING, 1986).

Volumes de 18,0 mL de CMH contendo a suspensão bacteriana devidamente padronizada (10^6 UFC/mL), foram transferidos para tubos contendo 2 mL das soluções das drogas ou de suas associações. No tubo controle foi adicionado 2,0 mL de solução fisiológica (0,85% de NaCl) previamente esterilizada.

A enumeração inicial das bactérias (T_0), foi efetuada a partir de 0,5 mL do inóculo padronizado diluído de 10^{-1} a 10^{-6} . De cada diluição obtida, foram semeadas alíquotas ($n=4$) de 10 μ L sobre o AMH. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 horas.

O acompanhamento da morte bacteriana foi realizado por um período de 24 horas. Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas de cada tubo contendo os micro-organismos expostos às drogas e as suas associações foram diluídas de 10^{-1} a 10^{-6} ,

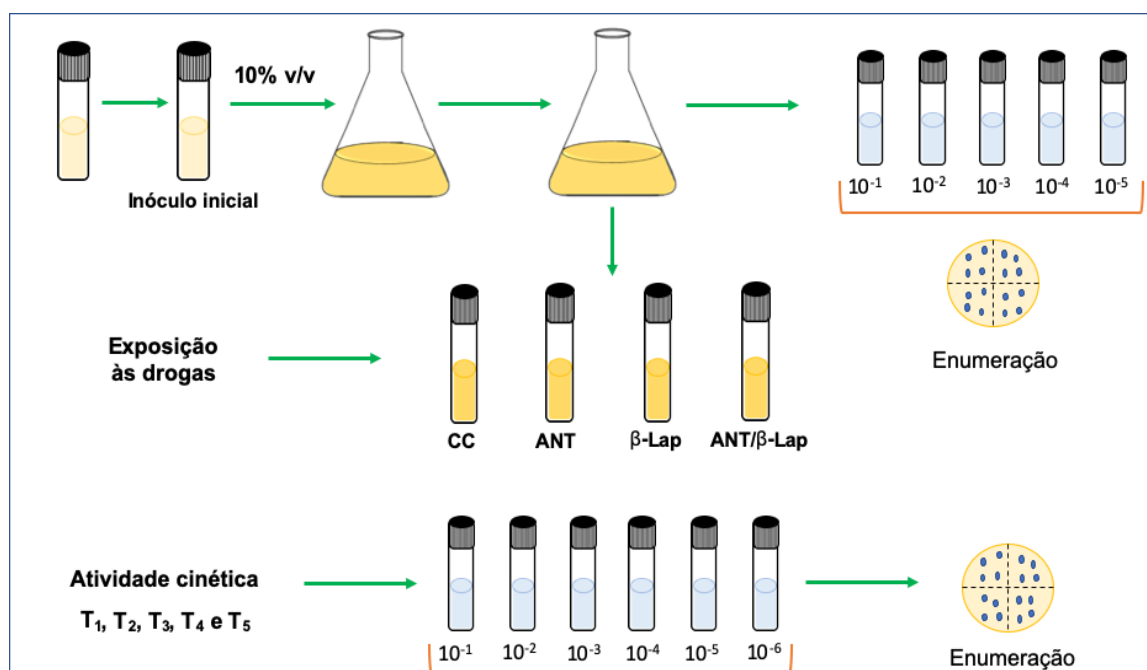
e em seguida semeadas alíquotas ($n=4$) de 10 μL de todas as diluições em AMH. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 horas.

Este processo foi realizado logo após o contato e repetido após 3 (T_1), 6 (T_2), 9 (T_3), 12 (T_4) e 24 (T_5) (figura 15). Os valores obtidos permitiram traçar uma curva representando o número de células viáveis, expresso em logaritmo decimal, em função do tempo de exposição o qual foi expresso em horas. Os experimentos foram realizados três vezes.

4.3.6 Critérios de interpretação

Os critérios estabelecidos que determinam um efeito bactericida relevante, são caracterizados por um decréscimo do inóculo bacteriano inicial igual ou superior a 2 $\log_{10}$, independente de estarem as drogas em associação ou não, uma vez que os valores iguais a 2 $\log_{10}$ obtidos nas manipulações *in vitro*, podem ser correlacionados aos resultados *in vivo* (BARRY *et al*, 1999; LORIAN, 1992).

Figura 15 – Diagrama da cinética de morte pelo método *Time Kill Curves*



CC: Controle de crescimento; ANT: Antimicrobiano isolado; β -Lap: β -Lapachona isolada; ANT/ β -Lap: Associação antimicrobiano/ β -Lapachona.

Fonte: O autor.

4.3.7 Alterações ultra estruturais

Enterococcus faecalis ATCC 51299 foi cultivado em CMH e volumes de 18 mL contendo a suspensão padronizada (10^6 UFC/mL) foram transferidos para tubos contendo 2 mL das soluções de β -Lapachona e vancomicina ou da associação, nas respectivas CIM. No tubo controle foi adicionado 2,0 mL de solução de NaCl (0,85%) previamente esterilizada. As culturas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram centrifugadas e os precipitados fixados em uma solução de tampão cacodilato de sódio pH 7,2 adicionado de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% por 4 horas a 27 °C.

Os precipitados foram lavados e centrifugados por 10 minutos no mesmo tampão e esse procedimento repetido por três vezes. Posteriormente, os precipitados foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 2%, ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 Mm em tampão cacodilato de sódio à 0,1 M por 1 hora e lavada em tampão cacodilato de sódio.

As amostras foram desidratadas utilizando gradientes de soluções de acetona e depois adicionadas à resina Epon 812 (Sigma, EUA). Em seguida seções ultrafinas foram obtidas através de um ultramicrotomo (Leica UC6), coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinado em microscópio eletrônico de transmissão Morgani-FEI®.

4.4 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* E ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA β -LAPACHONA, VANCOMICINA E SUA ASSOCIAÇÃO

4.4.1 Micro-organismos

Um grupo composto por 11 cepas de *Enterococcus faecalis* foi utilizado para o estudo para o estudo da capacidade de formação de biofilme: 01 cepa de referência (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299) e 10 cepas clínicas (LFBM 421, LFBM 335, LFBM 918, LFBM 240, LFBM 417, LFBM 168, LFBM 671, LFBM 189, LFBM 160 e LFBM 272).

Em um segundo momento, foram selecionadas 4 cepas para determinar a capacidade antibiofilme após exposição à β -lapachona, vancomicina e associação:

01 cepa de referência (*Enterococcus faecalis* ATCC 51299) e 3 cepas clínicas (LFBM 421, LFBM 335 e LFBM 417).

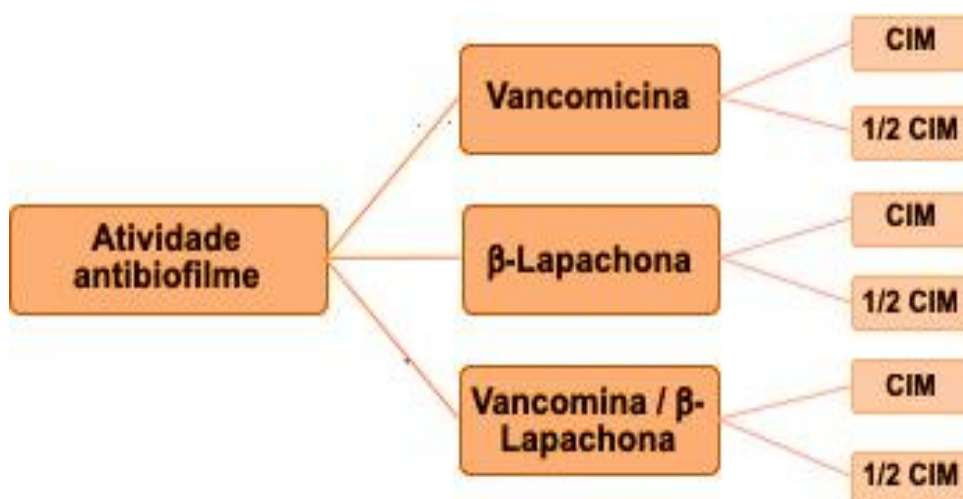
4.4.2 Meio de cultura

O Caldo Mueller-Hinton (CMH) foi utilizado para o cultivo dos enterococos. Ágar vermelho congo foi utilizado para triagem fenóptica. O caldo Triptona Soja (TSB) suplementado com glicose (2%) foi utilizado para padronização do inóculo, determinação da atividade biofilme e antibiofilme, e, para as diluições seriadas das drogas.

4.4.3 Agentes Antimicrobianos

Para avaliação da atividade antibiofilme foram utilizados os seguintes agentes antimicrobianos: Cloridrato de vancomicina (Antibióticos do Brasil-ABL) e β -Lapachona (Departamento de Antibióticos – UFPE). Para a atividade antibiofilme foram propostas as seguintes associações descritas na figura 16:

Figura 16 – Diagrama das associações dos antimicrobianos utilizados para determinação da atividade anti-biofilme



Fonte: O autor.

4.4.4 Triagem fenotípica para avaliar a formação de biofilme

A avaliação fenotípica da formação do biofilme foi realizada pelo cultivo das cepas de *E. faecalis* em placas contendo ágar vermelho congo (AVC) (KOUIDHI *et al*, 2011), cuja composição para 1 litro é: caldo BHI (37,0 g/l) adicionado 0,8 g de corante Vermelho do Congo (Merck, Alemanha) e 36 g de sacarose (Vetec). Os micro-organismos, a partir de cultivos (18 h) em CMH, foram semeados em placas contendo AVC pela técnica de estrias com auxílio de alça de platina (10 μ L). As placas foram semeadas e incubadas a 37 °C por 24 horas. Para classificação das colônias formadoras de “*slime*”, Fallah *et al* (2017) utilizou a seguinte escala: Colônias muito negras a negras foram consideradas fortes produtoras de biofilme, enquanto as cores quase negras indicaram uma fraca atividade de produção de biofilme. Por outro lado, cepas com colônias vermelhas foram classificadas como incapazes de produzir o biofilme.

4.4.5 Padronização do inóculo

O inóculo foi padronizado de acordo com o protocolo descrito no Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016). Para realização dos testes, os micro-organismos foram cultivados em AMH a 37°C, após 18-24 horas de incubação, colônias isoladas foram inoculadas em CMH e a turbidez desta suspensão comparada ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, equivalente a 10⁸ UFC/mL. Em seguida, a suspensão bacteriana foi diluída (1:10) em CMH para a obtenção da concentração 10⁶ UFC/mL.

4.4.6 Avaliação da formação de biofilme *in vitro*

A quantificação do biofilme formado por cepas de *E. faecalis* foi baseada no método descrito por Stepanovic *et al* (2000). Aos poços de uma microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo chato estéril (Marca), foram adicionados 200 μ L da suspensão padronizada em 10⁶ UFC/mL de cada cepa de enterococos. O controle negativo foi utilizado somente o meio TSB. O experimento foi realizado três vezes. As placas foram incubadas, por 48 horas a 37 °C. O conteúdo da placa foi então

retirado e os poços lavados duas vezes com 200µL de solução de NaCl (0,85%) esterilizada. As células aderidas foram fixadas com 200µL de metanol (Merck®) e após 15 minutos esses poços foram esvaziados e secos. Os biofilmes foram corados por 20 minutos com uma solução (200µL/poço) de cristal violeta 2% (Labor®). O excesso do cristal violeta foi removido e poços foram, novamente, esvaziados e secos. O cristal violeta complexado às células foi ressolubilizado com 200µL/poço com ácido acético glacial (Vetec®) a 30% (v/v). De cada poço foram pipetados 160µL e dispensados em poços em uma nova microplaca. A densidade ótica (DO) de cada poço foi medida a 630nm utilizando um leitor de microplacas. O ácido acético glacial (Vetec®) a 30% (v/v) foi usado como branco.

4.4.7 Critérios de Interpretação

Baseado na DO produzida pelos biofilmes, as cepas de *E. faecalis* foram classificadas nas seguintes categorias: não produtoras de biofilme, fracas, moderadas ou fortes produtoras de biofilme (STEPANOVIC et al., 2000) como descritas na tabela 4:

Tabela 4 – Critério de interpretação para produção de biofilme

Classificação	Densidade ótica média (DO)
Não aderente	$OD \leq OD_C$
Fracamente aderente	$2 \times OD_C < OD \leq 2 \times OD_C$
Moderadamente aderente	$2 \times OD_C < OD \leq 4 \times OD_C$
Fortemente aderente	$4 \times OD_C < OD$

O valor da densidade ótica controle (DOC) = DO média do controle negativo + 3 x desvio-padrão do controle negativo.

Fonte: STEPANOVIC et al, 2000.

4.4.8 Determinação da atividade antibiofilme

A atividade antibiofilme da β -Lapachona e vancomicina foi determinada de acordo com Hashem e colaboradores (2017) com modificações.

As drogas foram diluídas em TSB suplementado com glicose (2%) de forma a obter soluções equivalentes a 2 vezes àquela desejada, ou seja, 2x CIM ou 2 x 1/2 CIM. Dessas soluções foram pipetados 100µL e depositados em poços de

microplacas, os quais receberam 100µL das suspensões padronizadas dos enterococos (10^6 UFC/mL). Para a avaliação das associações foram pipetados 50µL de cada droga em suas respectivas concentrações, e em seguida 100µL da suspensão bacteriana. A técnica para a fixação, coloração e leitura do biofilme foi a mesma descrita no item 4.4.6.

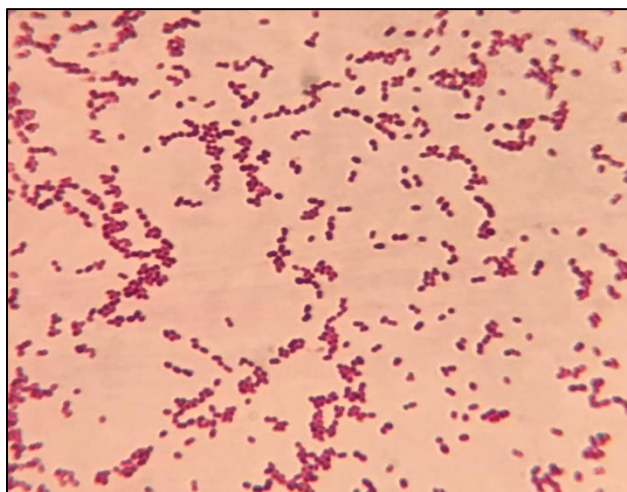
5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.1.1 Identificação bioquímica das cepas clínicas de *E. faecalis*

Enterococcus faecalis são microscopicamente visualizados como cocos Gram positivos, e variam em tamanho desde 0,2 a 0,6 μ m, dispersas no campo microscópico ou agregadas em pares ou cadeias curtas (figura 17). Os resultados da identificação bioquímica das cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* utilizadas neste estudo, estão representados na tabela 5 e figura 18.

Figura 17 – *Enterococcus faecalis* pelo método de Gram

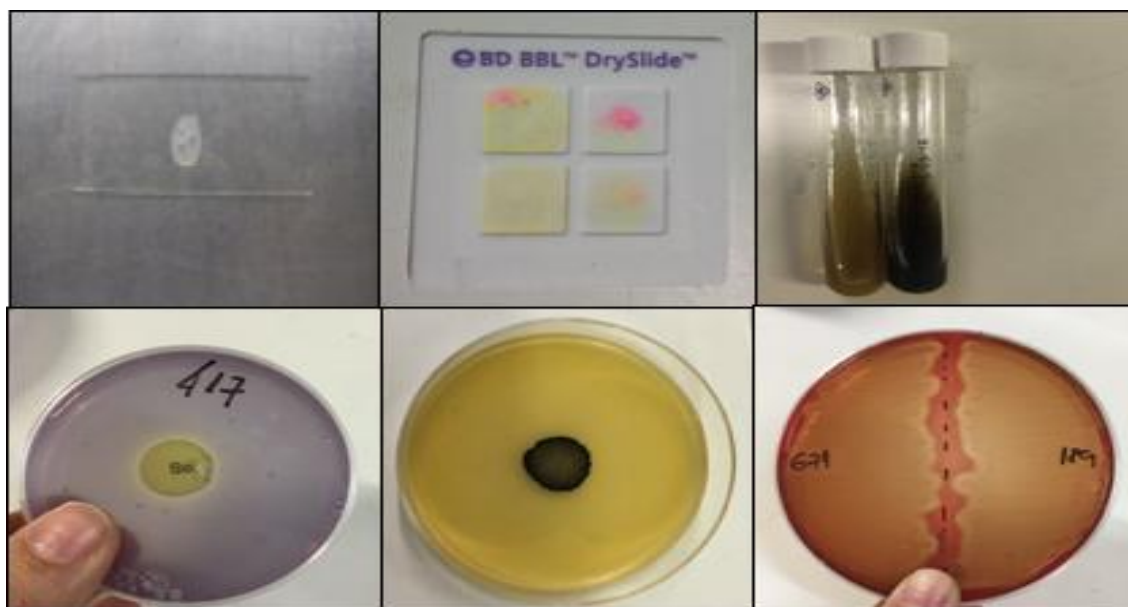


Fonte: O autor.

Tabela 5 – Identificação de *Enterococcus faecalis* por reações bioquímicas e fisiológicas

	Reações
Produção de catalase	Negativa
Crescimento em NaCl (6,5%)	Positivo
Produção de pirrolidonil arilamidase (PYR)	Positiva
Hidrólise da esculina	Positiva
Assimilação do sorbitol	Positiva
Crescimento em telurito de potássio	Positivo
Hemólise em ágar sangue	β -hemólise

Fonte: O autor.

Figura 18 – Identificação bioquímica de *Enterococcus faecalis*

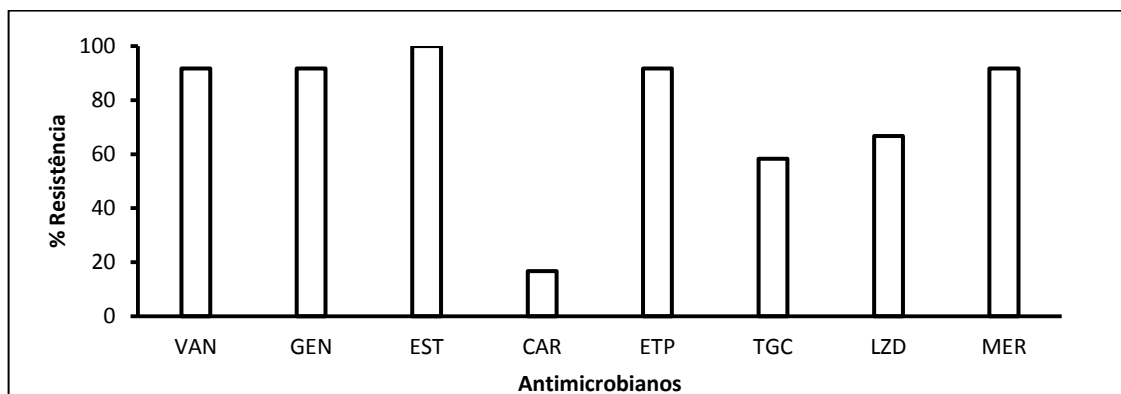
Fonte: O autor.

5.1.2 Determinação do fenótipo de resistência

O perfil fenotípico de resistência das cepas de *Enterococcus faecalis* utilizadas neste estudo e oriundas de hemoculturas está descrito na tabela 4. As cepas apresentaram baixa susceptibilidade a ampla variedade antimicrobianos testados, apresentando resistência a aminoglicosídeos, β -lactâmicos, glicopeptídeos, carbanenêmicos, oxazolidinonas e gliciliclinas. Das cepas de *E. faecalis* utilizadas neste estudo, 91,7% apresentaram resistência à vancomicina, gentamicina, meropenem e ertapenem, e 66,7% foram resistentes a linezolida.

Assim como, 58,7% das cepas apresentaram resistência a tigeclina e 16,7% a carbapenicina (figura 19).

Figura 19: Perfil de susceptibilidade de *E. faecalis* frente a antimicrobianos



VAN-vancomicina; GEN-gentamicina; EST-estreptomicina; CAR-Carbenicilina; ETP-ertapenem; TGC-Tigeciclina; LZD-Linezolida; MER-meropenem.

Fonte: O autor.

5.1.3 Determinação da atividade antimicrobiana

Os valores de CIM e CBM das naftoquinonas, Lapachol, α -Lapachona e β -Lapachona e dos antimicrobianos, vancomicina, ampicilina, gentamicina, ciprofloxacino e linezolida frente a 12 cepas de *E. faecalis* estão apresentados na tabela 5.

Todas as cepas de *E. faecalis* apresentaram resistência aos agentes antimicrobianos testados. Os valores de CIM para vancomicina variaram entre 128 e 1024 $\mu\text{g/mL}$. Para gentamicina os valores de CIM variaram entre 256 e 16 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de CIM para ampicilina variaram 64 e 16 $\mu\text{g/mL}$. Para ciprofloxacino os valores variaram entre 128 e 16 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de CIM para a linezolida variaram entre 128 e 64 $\mu\text{g/mL}$.

As naftoquinonas foram efetivas para inibir o crescimento de *E. faecalis*. O Lapachol apresentou moderada atividade frente as cepas de *E. faecalis* com valores de CIM igual a 640 $\mu\text{g/mL}$ para todas as cepas avaliadas. A α -Lapachona apresentou atividade antibacteriana que variou de fraca a moderada, com valores de CIM entre 640 e 160 $\mu\text{g/mL}$. A β -Lapachona apresentou atividade moderada com valores de CIM variando entre 320 e 160 $\mu\text{g/mL}$.

As cepas de *E. faecalis* utilizadas neste estudo apresentaram perfil de resistência aos agentes antimicrobianos avaliados. Este perfil de resistência

selecionou os micro-organismos para o estudo da interação entre a β -Lapachona e agentes antimicrobianos. Os valores de CBM foram superiores à CIM numa diluição.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA

Os valores da CIM, do índice ICIF e da redução dos valores da CIM obtidos pelas associações entre β -Lapachona com vancomicina, ou gentamicina, ou ampicilina e ou ciprofloxacino frente às 11 cepas de *E. faecalis* (LFBM 421, LFBM 335, LFBM 918, LFBM 240, LFBM 417, LFBM 168, LFBM 671, LFBM 189, LFBM 160, LFBM 272 e ATCC 51299) estão apresentados na tabela 6.

Concentrações sub-inibitórias e inferiores a 320 $\mu\text{g/mL}$ da β -Lapachona aumentaram a atividade anti-enterocócica da vancomicina, gentamicina, ampicilina e ciprofloxacino. A atividade sinérgica foi detectada por uma diminuição superior ou igual a duas vezes os valores da CIM dos agentes antimicrobianos em associação com a β -Lapachona por um valor de ICIF $\leq 0,5$.

A associação β -Lapachona/vancomicina foi sinérgica, apresentou-se sinérgica cujos valores de ICIF variaram de 0,24 a 0,37. A CIM da vancomicina individual (128-1024 $\mu\text{g/mL}$) foi reduzida em até sete vezes para as cepas avaliadas. Após associação com a β -Lapachona, os valores da CIM da vancomicina variaram entre 4-16 $\mu\text{g/mL}$.

A combinação da β -Lapachona com a gentamicina inibiu o crescimento de todas as cepas de *E. faecalis*. Os valores do ICIF variaram entre 0,140 – 0,375. A CIM da gentamicina individual (16-256 $\mu\text{g/mL}$) foi reduzida para todas as cepas, com valores entre 0,5-32 $\mu\text{g/mL}$.

A associação ampicilina/ β -Lapachona inibiu o crescimento de *E. faecalis* com os valores de ICIF que variaram entre 0,156 – 0,375. A CIM da ampicilina individual foi reduzida em até 4 vezes para as cepas avaliadas. Após associação com a β -Lapachona, os valores da CIM da ampicilina variaram entre 2-8 $\mu\text{g/mL}$.

A combinação da β -Lapachona com ciprofloxacino foi sinérgica para a maioria das cepas de *E. faecalis*, com exceção das cepas LFBM 671 e LFBM 272, onde a associação foi aditiva. Para os resultados sinérgicos, os valores de CIM da droga foram reduzidos em até cinco vezes. Os resultados estão representados graficamente através de isobogramas (figuras 20 a 27).

Tabela 6 – Perfil de Susceptibilidade de cepas de *Enterococcus faecalis*

<i>Enterococcus faecalis</i>	Diâmetro dos halos de inibição (mm)							
	VAN	GET	EST	CAR	ETP	TGC	LZD	MER
LFBM 421	11,23 (R)	9,40 (R)	0,00 (R)	17,32 (S)	8,19 (R)	10,56 (R)	12,68 (R)	13,54 (R)
LFBM 335	14,60 (R)	11,93 (R)	0,00 (R)	19,00 (S)	0,00 (R)	16,33 (S)	18,11 (R)	0,00 (R)
LFBM 918	16,58 (R)	12,77 (R)	0,00 (R)	22,29 (S)	9,43 (R)	17,35 (S)	20,57 (R)	16,99 (R)
LFBM 240	4,29 (R)	7,43 (R)	0,00 (R)	16,75 (S)	3,89 (R)	15,04 (R)	17,12 (R)	8,44 (R)
LFBM 417	0,00 (R)	12,51 (R)	0,00 (R)	0,00 (R)	0,00 (R)	23,27 (S)	23,60 (S)	0,00 (R)
LFBM 168	12,70 (R)	10,19 (R)	0,00 (R)	11,88 (R)	7,34 (R)	11,07 (R)	13,07 (R)	15,91 (R)
LFBM 671	14,19 (R)	6,71 (R)	0,00 (R)	22,76 (S)	6,63 (R)	14,84 (R)	17,20 (R)	10,02 (R)
LFBM 189	15,03 (R)	7,92 (R)	0,00 (R)	20,05 (S)	6,27 (R)	13,14 (R)	18,54 (R)	13,71 (R)
LFBM 160	14,17 (R)	11,55 (R)	0,00 (R)	20,21 (S)	9,13 (R)	15,23 (R)	16,79 (R)	13,21 (R)
LFBM 272	0,00 (R)	11,48 (R)	0,00 (R)	21,85 (S)	0,00 (R)	0,00 (R)	24,33 (S)	0,00 (R)
ATCC 27212	27,81 (S)	17,91 (S)	0,00 (R)	44,73 (S)	16,17 (S)	31,89 (S)	29,89 (S)	18,70 (S)
ATCC 51299	0,00 (R)	0,00 (R)	0,00 (R)	35, 27 (S)	12,61 (R)	34,37 (S)	34,83 (S)	14,72 (R)

VAN – vancomicina; GET – gentamicina; EST – estreptomicina; CAR – Carbanenicilina; ETP – Ertapenem; TGC – Tigeciclina; LZD – linezolide; MER – meropenem. (S) Sensível; (R) Resistente.

Fonte: O autor.

Tabela 7 – Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima de naftoquinonas e agentes antimicrobianos frente a cepas de *Enterococcus faecalis* multidroga resistentes

<i>Enterococcus faecalis</i>	CIM/CBM (µg/mL)							
	VAN	GET	AMP	CIP	LNZ	LAP	α-LAP	β-LAP
LFBM 421	128/256	32/64	64/64	32/64	64/128	640/>640	160/320	320/320
LFBM 335	512/1024	32/64	32/64	32/64	64/128	640/>640	160/320	160/320
LFBM 918	128/256	32/64	32/64	128/256	64/128	640/>640	320/640	160/320
LFBM 240	128/256	32/64	32/64	64/128	64/128	640/>640	320/640	160/320
LFBM 417	128/256	64/128	64/64	32/64	32/64	320/640	320/640	160/320
LFBM 168	128/256	64/128	32/64	16/32	64/128	320/640	320/640	160/320
LFBM 671	128/256	16/32	64/64	16/32	64/128	640/>640	640/640	160/320
LFBM 189	128/256	32/64	32/64	16/32	64/128	640/>640	640/640	160/320
LFBM 160	128/256	16/16	32/64	16/32	32/64	640/>640	640/640	160/320
LFBM 272	1024/>1024	16/32	16/32	16/32	32/64	640/>640	640/640	160/160
ATCC 27212	4/8	8/16	4/8	1/4	4/8	640/>640	320/640	320/320
ATCC 51299	1024/>1024	256/512	32/64	64/128	128/256	640/>640	320/640	320/320

VAN – vancomicina; GET – gentamicina; AMP – ampicilina; CIP – ciprofloxacino; LNZ – linezolida; LAP – lapachol α-LAP – α-Lapachona; β-LAP – β-lapachona.

Fonte: O autor.

Tabela 8 – Associação da β -Lapachona a agentes antimicrobianos frente a *Enterococcus faecalis* multidroga resistentes

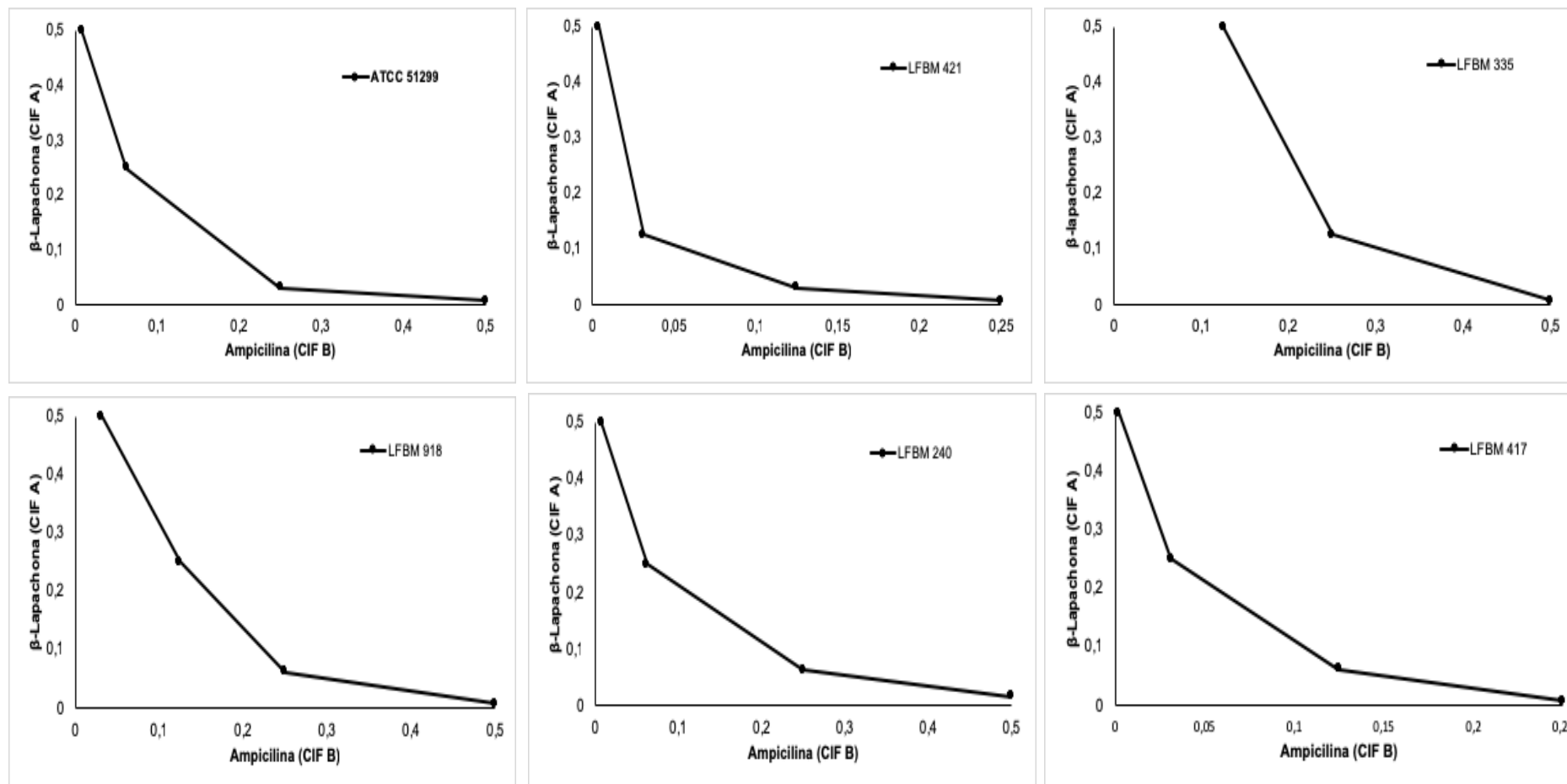
<i>Enterococcus faecalis</i>	Associação	CIM individual ($\mu\text{g/mL}$)	CIM associação ($\mu\text{g/mL}$)	CIF Individual	ICIF	Interpretação	% CIM Reduzida
LFBM 421	β -Lap / VAN	320/128	40/16	0,12/0,12	0,24	Sinérgico	87,5/87,5
	β -Lap / GEN	320/32	40/2	0,12/0,06	0,18	Sinérgico	87,5/93,7
	β -Lap / AMP	320/64	10/8	0,03/0,12	0,15	Sinérgico	96,9/86,1
	β -Lap / CIP	320/32	80/4	0,25/0,12	0,37	Sinérgico	75/87,5
LFBM 335	β -Lap / VAN	160/512	40/4	0,25/0,01	0,26	Sinérgico	75/99,2
	β -Lap / GEN	160/32	40/2	0,25/0,06	0,31	Sinérgico	75/93,7
	β -Lap / AMP	160/32	20/8	0,12/0,25	0,37	Sinérgico	87,5/75
	β -Lap / CIP	160/32	40/8	0,25/0,25	0,50	Sinérgico	75/75
LFBM 918	β -Lap / VAN	160/128	40/16	0,25/0,12	0,37	Sinérgico	75/87,5
	β -Lap / GEN	160/32	40/4	0,25/0,12	0,37	Sinérgico	75/87,5
	β -Lap / AMP	160/32	10/8	0,06/0,25	0,31	Sinérgico	93,7/75
	β -Lap / CIP	160/128	20/16	0,12/0,12	0,24	Sinérgico	87,5/87,5
LFBM 240	β -Lap / VAN	160/128	40/16	0,25/0,12	0,37	Sinérgico	75/87,5
	β -Lap / GEN	160/32	5/4	0,03/0,12	0,15	Sinérgico	96,9/87,5
	β -Lap / AMP	160/32	40/2	0,25/0,06	0,31	Sinérgico	75/93,75
	β -Lap / CIP	160/64	10/16	0,063/0,25	0,313	Sinérgico	93,7/75
LFBM 417	β -Lap / VAN	160/128	40/8	0,25/0,06	0,31	Sinérgico	75/93,7
	β -Lap / GEN	160/64	5/8	0,03/0,12	0,15	Sinérgico	96,88/87,5
	β -Lap / AMP	160/64	10/8	0,06/0,12	0,18	Sinérgico	93,75/87,5
	β -Lap / CIP	160/32	40/8	0,25/0,25	0,50	Sinérgico	75/75
LFBM 168	β -Lap / VAN	160/128	40/16	0,25/0,12	0,37	Sinérgico	75/87,5
	β -Lap / GEN	160/64	20/4	0,01/0,12	0,13	Sinérgico	87,5/93,7
	β -Lap / AMP	160/32	20/4	0,12/0,12	0,24	Sinérgico	87,5/87,5
	β -Lap / CIP	160/16	80/0,063	0,5/0,004	0,50	Sinérgico	50/99,6
LFBM 671	β -Lap / VAN	160/128	20/16	0,12/0,12	0,24	Sinérgico	87,5/87,5

	β -Lap / GEN	160/16	40/0,5	0,25/0,03	0,28	Sinérgico	75/96,9
	β -Lap / AMP	160/64	20/8	0,12/0,12	0,24	Sinérgico	87,5/87,5
	β -Lap / CIP	160/16	80/4	0,50/0,25	0,75	Aditivo	50/75
LFBM 189	β -Lap / VAN	160/128	40/8	0,25/0,06	0,31	Sinérgico	75/93,7
	β -Lap / GEN	160/32	20/4	0,12/0,12	0,24	Sinérgico	87,5/87,5
	β -Lap / AMP	160/32	20/4	0,12/0,12	0,24	Sinérgico	87,5/87,5
	β -Lap / CIP	160/16	40/8	0,25/0,25	0,5	Sinérgico	75/50
LFBM 160	β -Lap / VAN	160/128	40/16	0,25/0,12	0,37	Sinérgico	75/87,5
	β -Lap / GEN	160/16	20/1	0,12/0,12	0,24	Sinérgico	87,5/93,7
	β -Lap / AMP	160/32	5/4	0,12/0,06	0,18	Sinérgico	96,9/87,5
	β -Lap / CIP	160/16	40/8	0,25/0,25	0,50	Sinérgico	75/50
LFBM 272	β -Lap / VAN	160/1024	40/16	0,25/0,12	0,37	Sinérgico	75/98,4
	β -Lap / GEN	160/16	10/1	0,06/0,06	0,12	Sinérgico	93,7/93,7
	β -Lap / AMP	160/16	20/2	0,125/0,125	0,25	Sinérgico	87,5/87,5
	β -Lap / CIP	160/16	10/8	0,50/0,06	0,56	Aditivo	93,7/50
ATCC 51299	β -Lap / VAN	320/1024	80/16	0,25/0,01	0,26	Sinérgico	75/98,4
	β -Lap / GEN	320/256	20/32	0,06/0,12	0,18	Sinérgico	93,7/87,5
	β -Lap / AMP	320/32	10/8	0,03/0,25	0,28	Sinérgico	96,9/75
	β -Lap / CIP	320/64	20/2	0,06/0,01	0,07	Sinérgico	93,75/96,9

CIM – Concentração Inibitória Mínima; CIF – Concentração Inibitória Fracionada; ICIF – Índice da Concentração Inibitória Fracionada; β -Lap - β -Lapachona; VAN – Vancomicina; GEN – Gentamicin; AMP – Ampicilina; CIP – Ciprofloxacina.

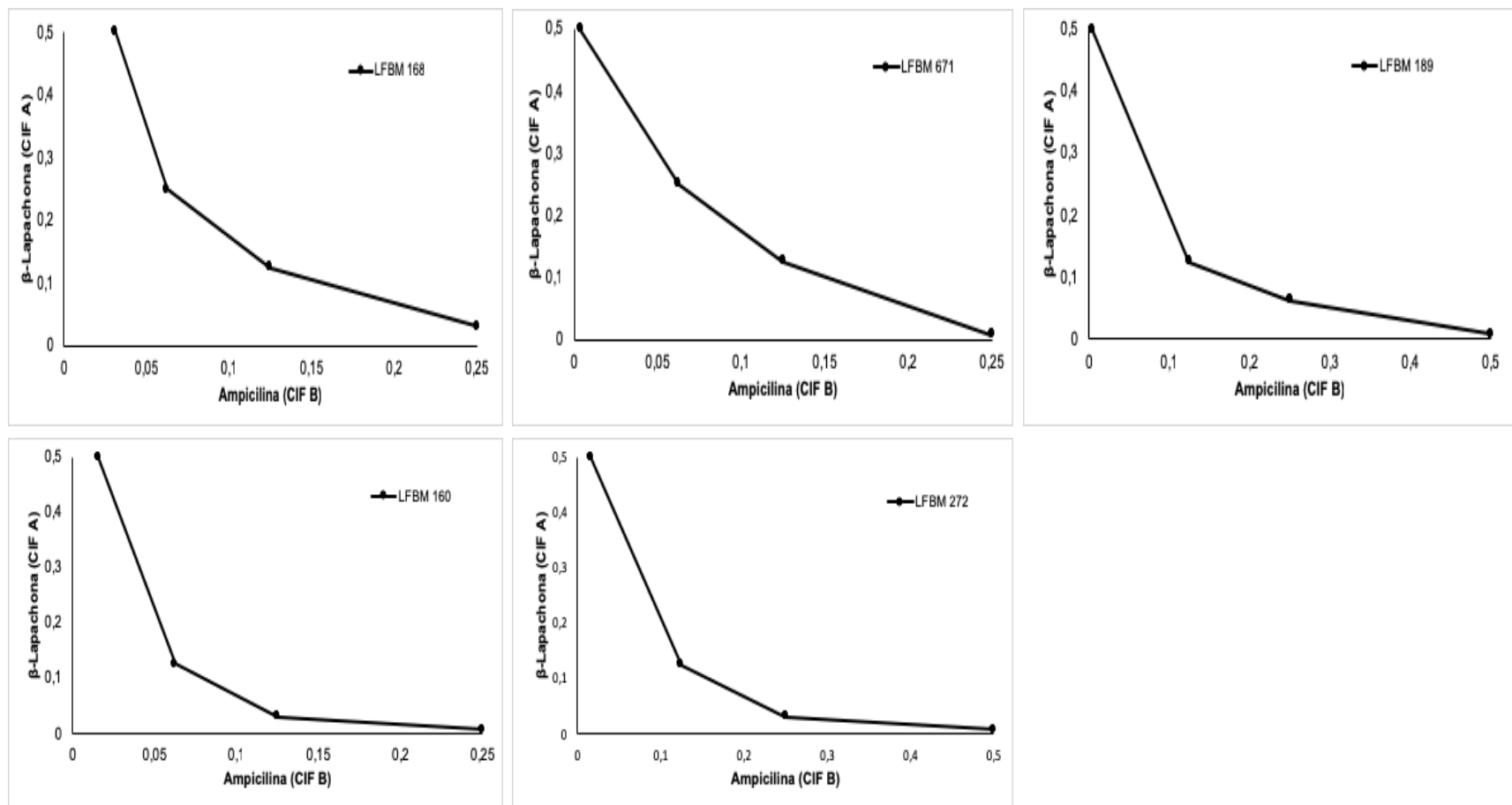
Fonte: O autor.

Figura 20 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com ampicilina frente às cepas de *Enterococcus faecalis* LFBM 51299, LFBM 421, LFBM 335, LFBM 918, LFBM 240, LFMB 417



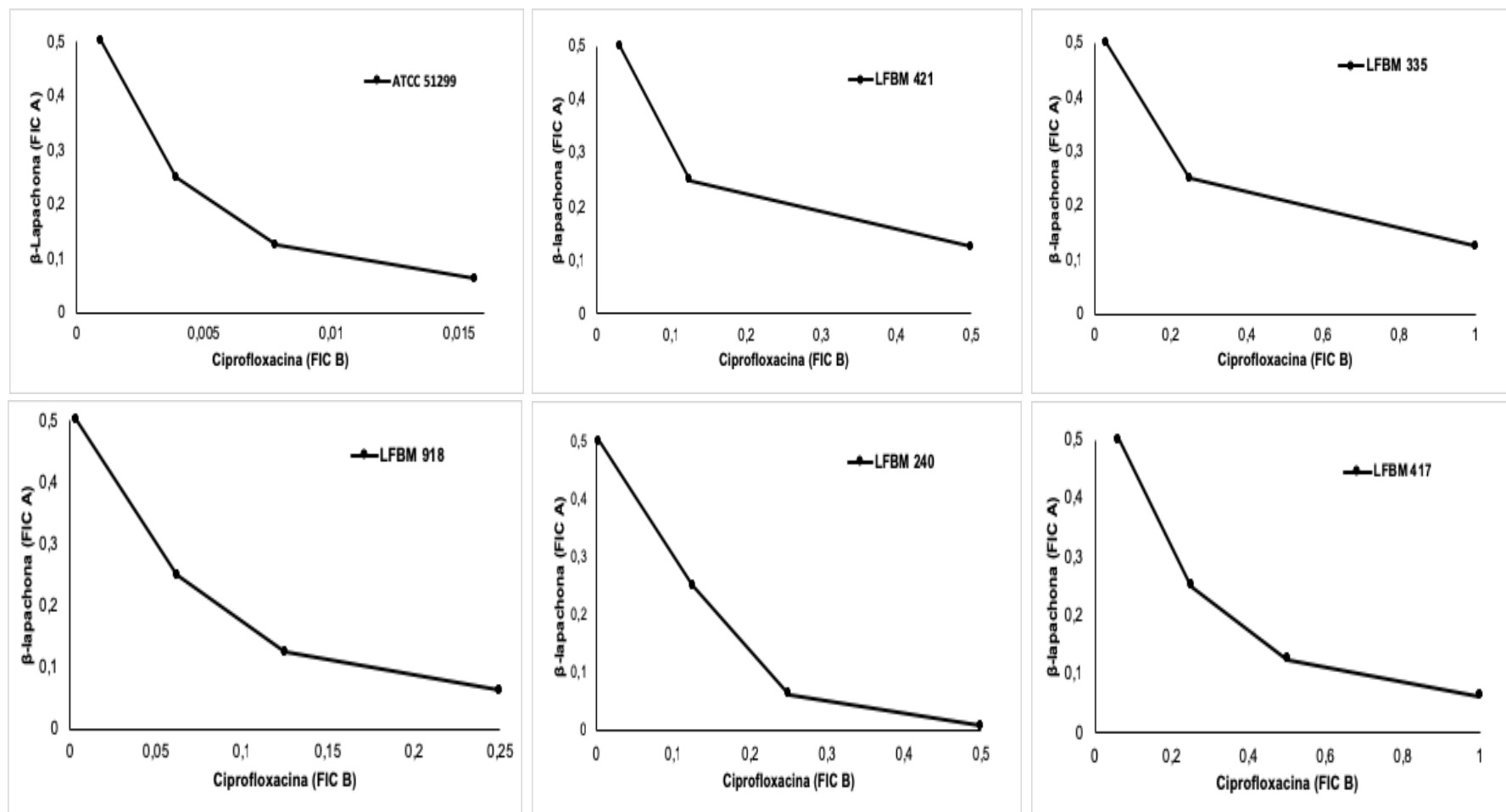
Fonte: O autor.

Figura 21 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com ampicilina frente às cepas de *Enterococcus faecalis* LFBM 168, LFBM 671, LFBM 189, LFBM 160, LFBM 272



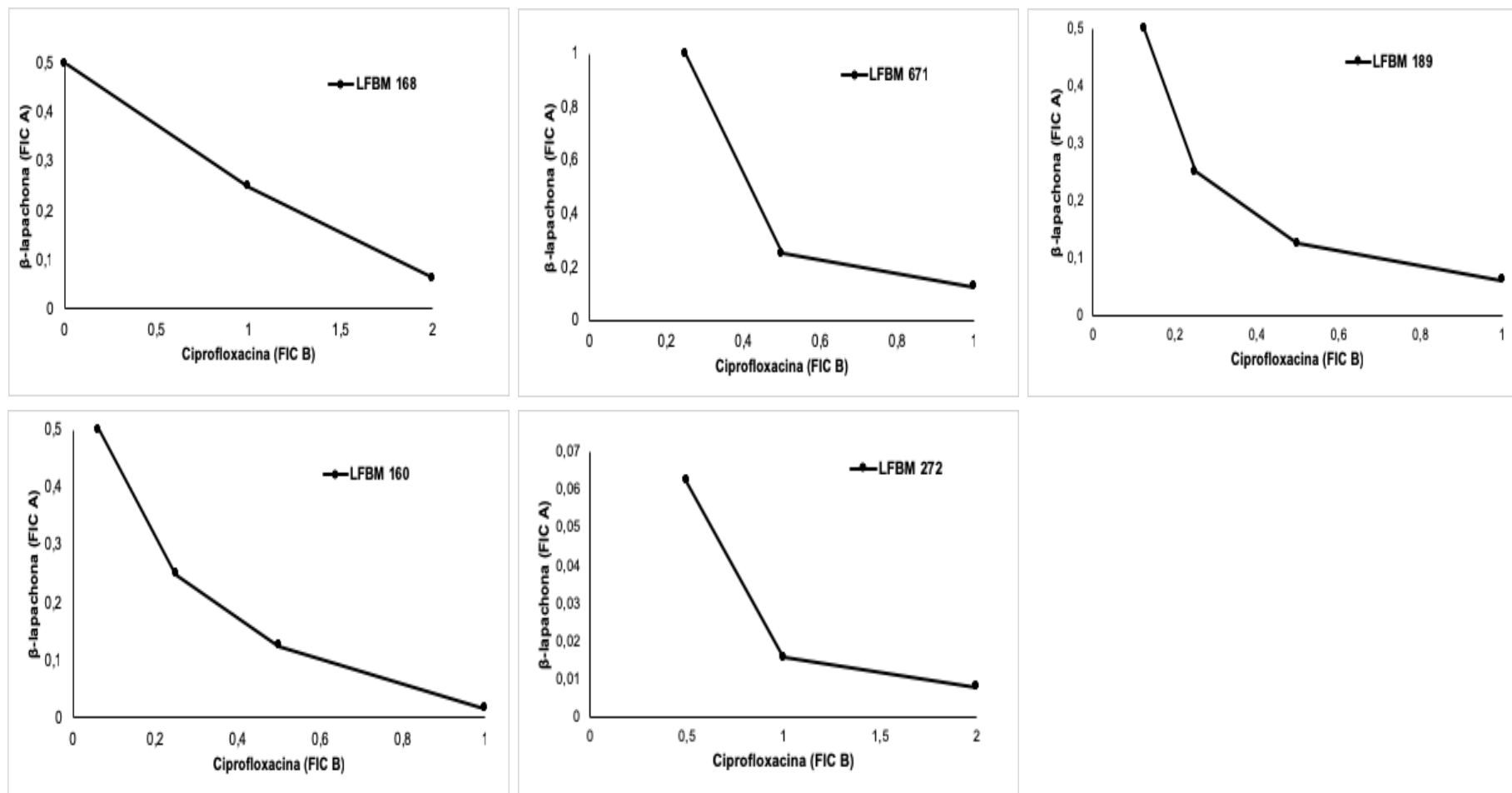
Fonte: O autor.

Figura 22 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com ciprofloxacina frente às cepas de *Enterococcus faecalis* LFBM 51299, LFBM 421, LFBM 335, LFBM 918, LFBM 240, LFMB 417



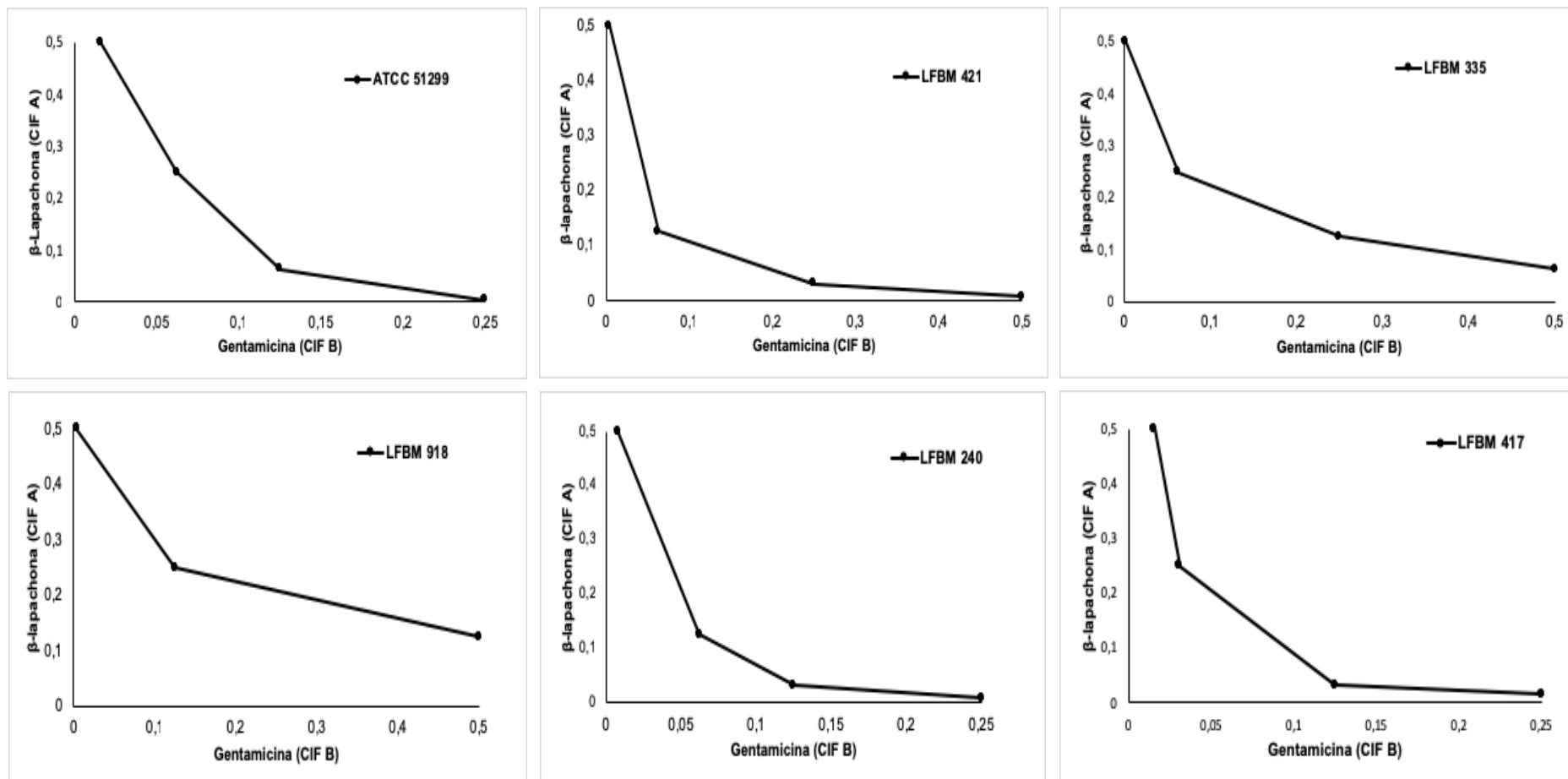
Fonte: O autor.

Figura 23 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com ciprofloxacina frente às cepas de *Enterococcus faecalis* LFBM168, LFBM 671, LFBM 189, LFBM 160, LFBM 272



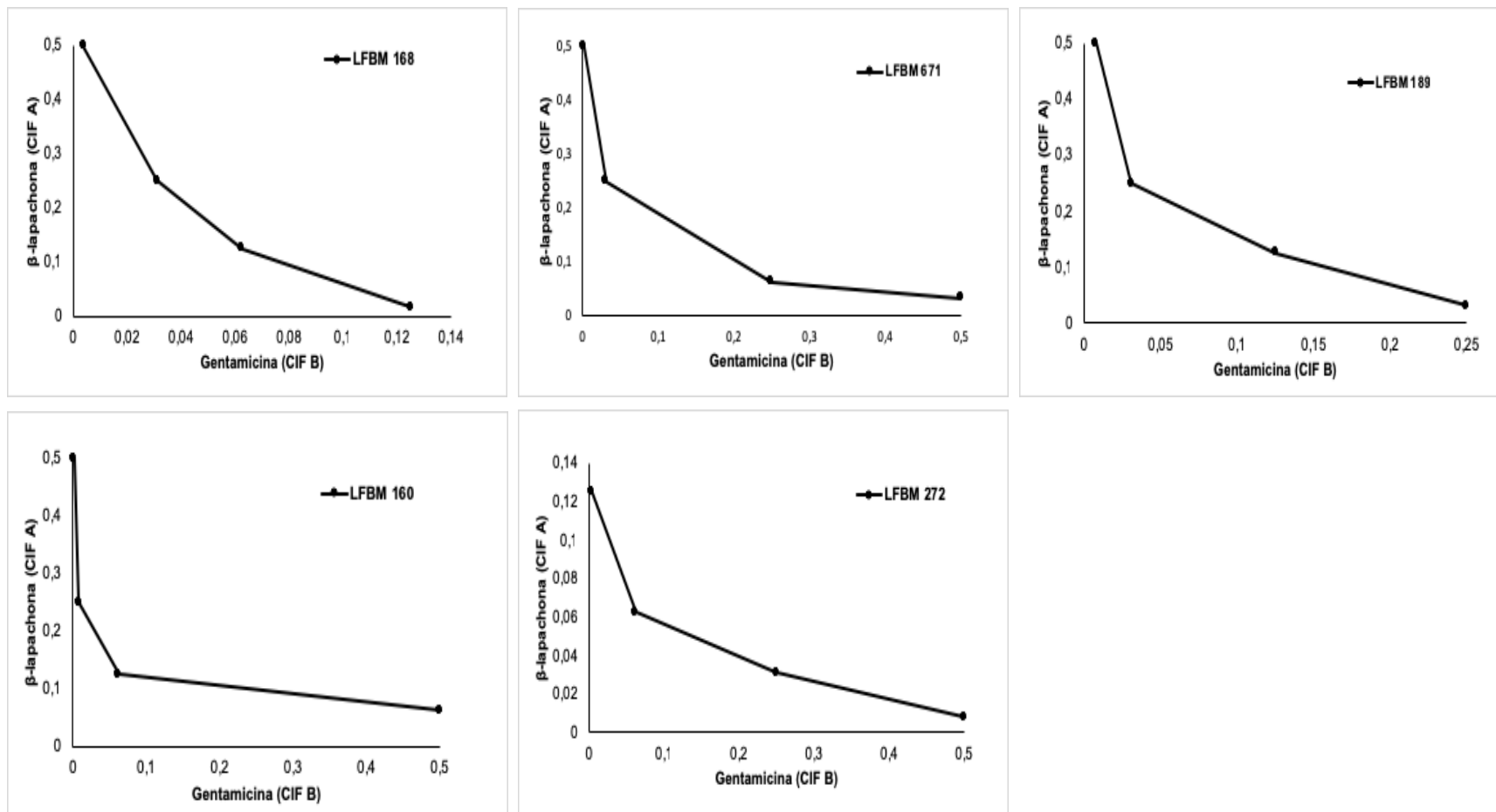
Fonte: O autor.

Figura 24 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com gentamicina frente às cepas de *Enterococcus faecalis* LFBM 51299, LFBM 421, LFBM 335, LFBM 918, LFBM 240, LFMB 417



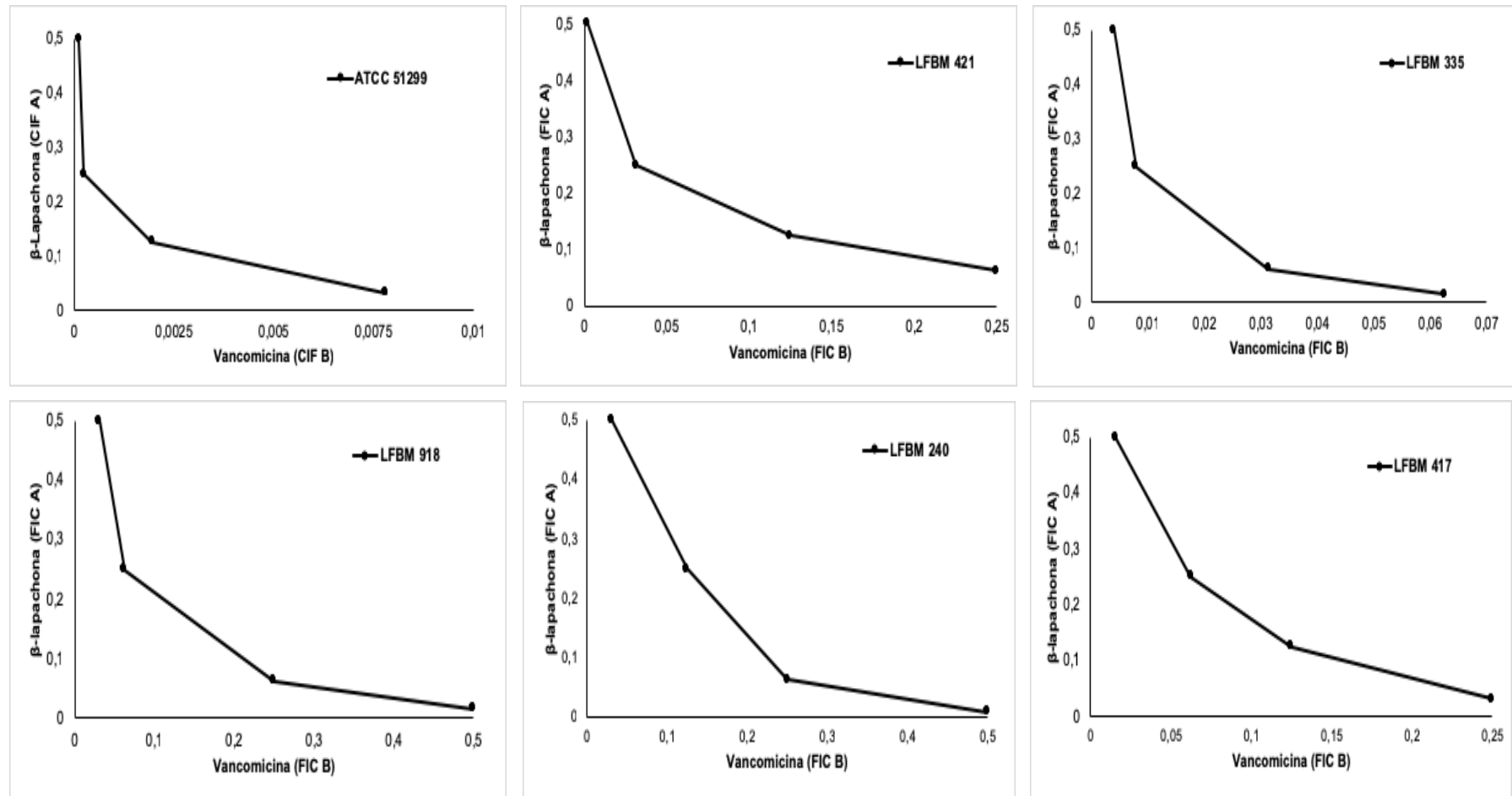
Fonte: O autor.

Figura 25 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com gentamicina frente às cepas de *Enterococcus faecalis* LFMB168, LFMB 671, LFMB 189, LFMB 160, LFMB 272



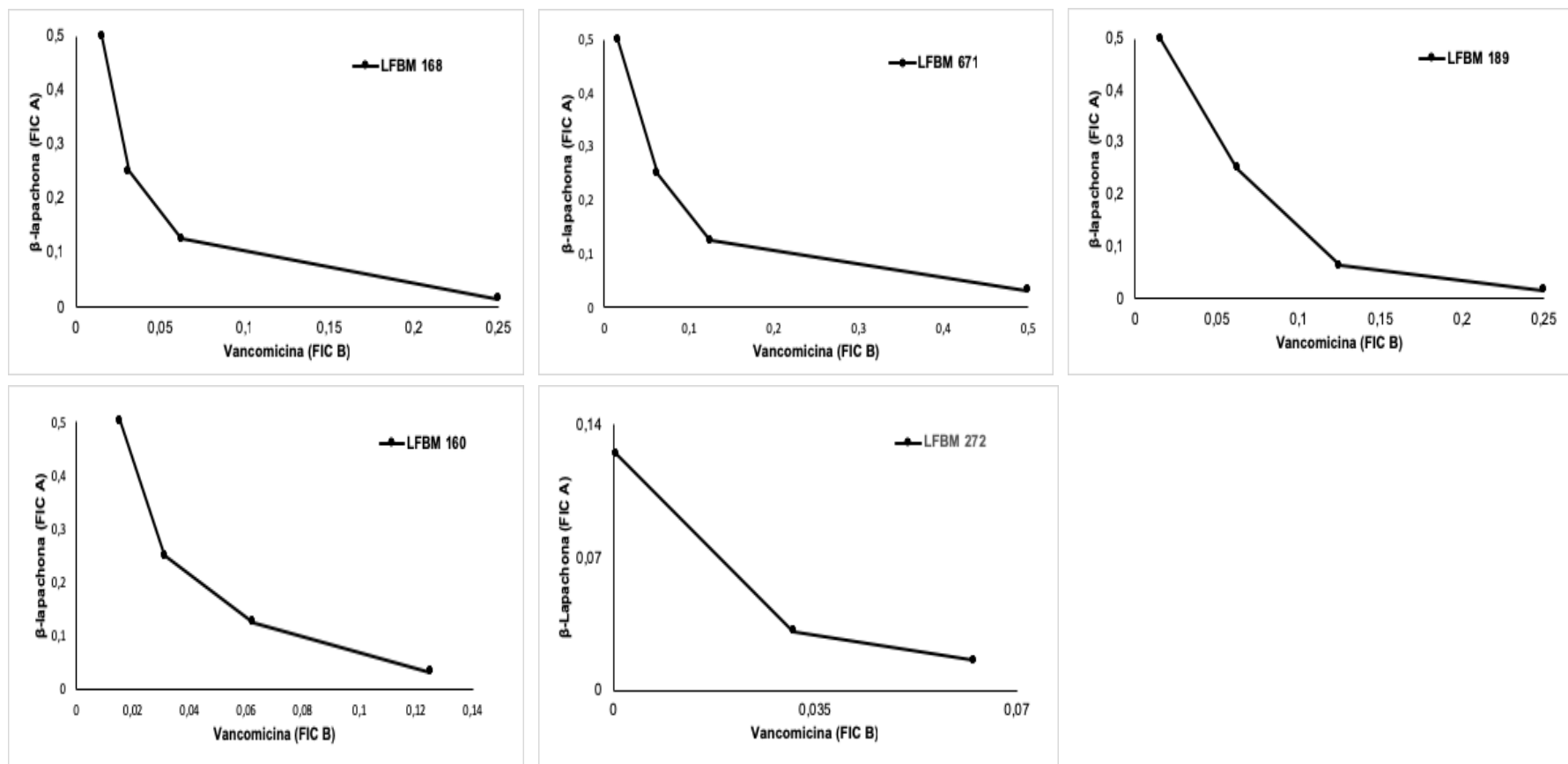
Fonte: O autor.

Figura 26 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com vancomicina frente às cepas de *Enterococcus faecalis* LFBM 51299, LFBM 421, LFBM 335, LFBM 918, LFBM 240, LFMB 417



Fonte: O autor.

Figura 27 – Isoblograma revelando o efeito sinérgico da β -Lapachona em associação com vancomicina frente às cepas de *Enterococcus faecalis* LFMB 168, LFMB 671, LFMB 189, LFMB 160, LFMB 272.



Fonte: O autor.

5.3 EFEITO BACTERICIDA DAS DROGAS E SUAS ASSOCIAÇÕES

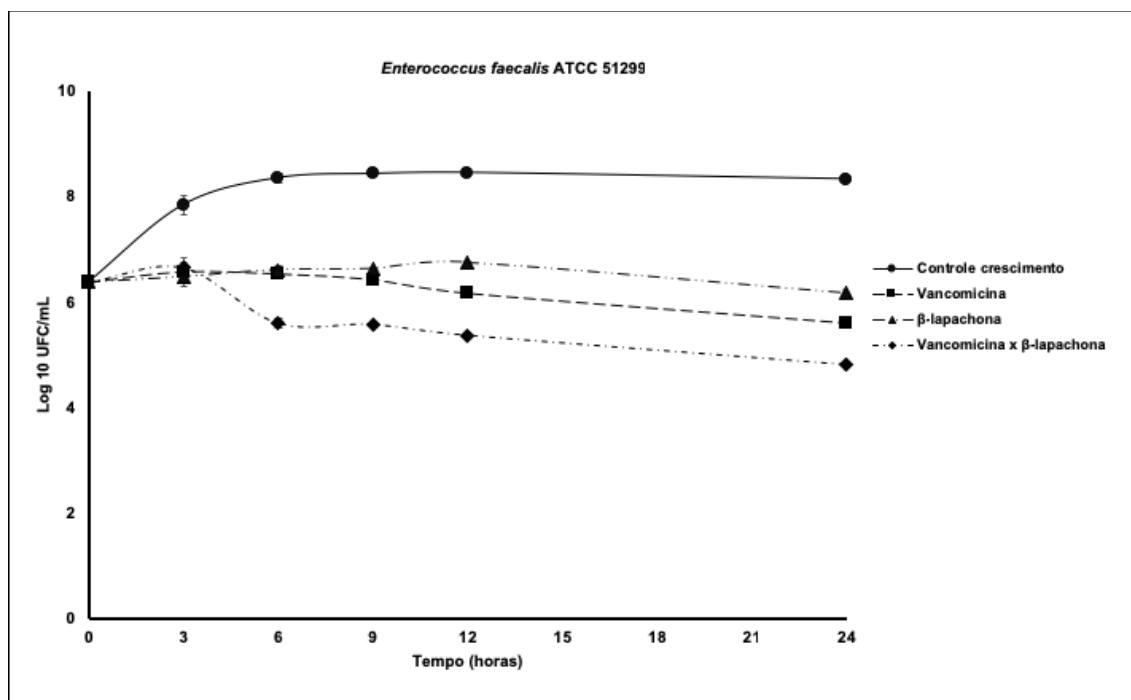
Os resultados expressos pelo logaritmo das Unidades Formadoras de Colônias em função do tempo de exposição após o contato de *E. faecalis* ATCC 51299 com β -Lapachona, vancomicina, ampicilina, gentamicina, linezolida e suas associações nas respectivas concentrações inibitórias, estão apresentados nas figuras 28, 29, 30 e 31.

Não foi observado efeito bactericida após exposição de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 as drogas e suas associações, exceto para ampicilina a qual, que reduziu o inóculo inicial em 2,93 $\log_{10}$.

A atividade antibacteriana das associações β -Lapachona/ antimicrobianos foi evidenciada e mostrou-se aditiva. Quando a cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 foi exposta as associações, houve uma redução no crescimento de 1,57 $\log_{10}$, 1,66 $\log_{10}$, 1,87 $\log_{10}$ e 0,8 $\log_{10}$ para associações com vancomicina, ampicilina, gentamicina e linezolida, respectivamente.

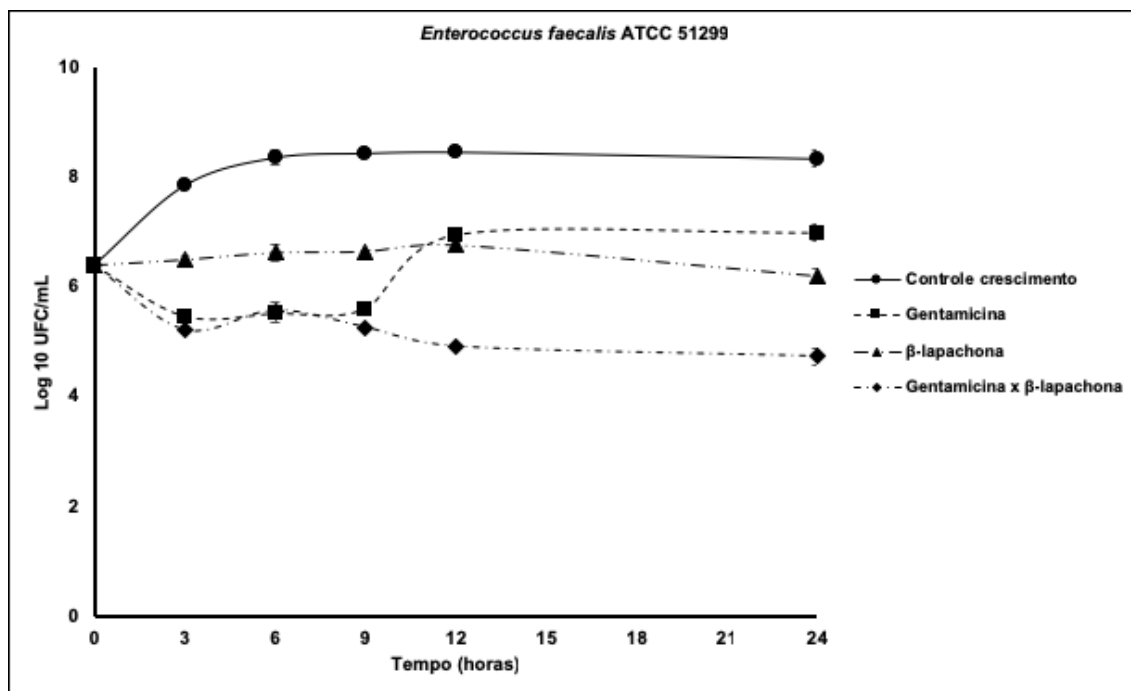
As associações apresentaram comportamentos semelhantes quanto à inibição do crescimento, pois mantiveram o número de células viáveis próximo ao valor do inóculo inicial durante 24 horas de exposição, mostrando o efeito bacteriostático.

Figura 28 – Efeito da associação Vancomicina/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações inibitórias, frente a *E. faecalis* ATCC 51299



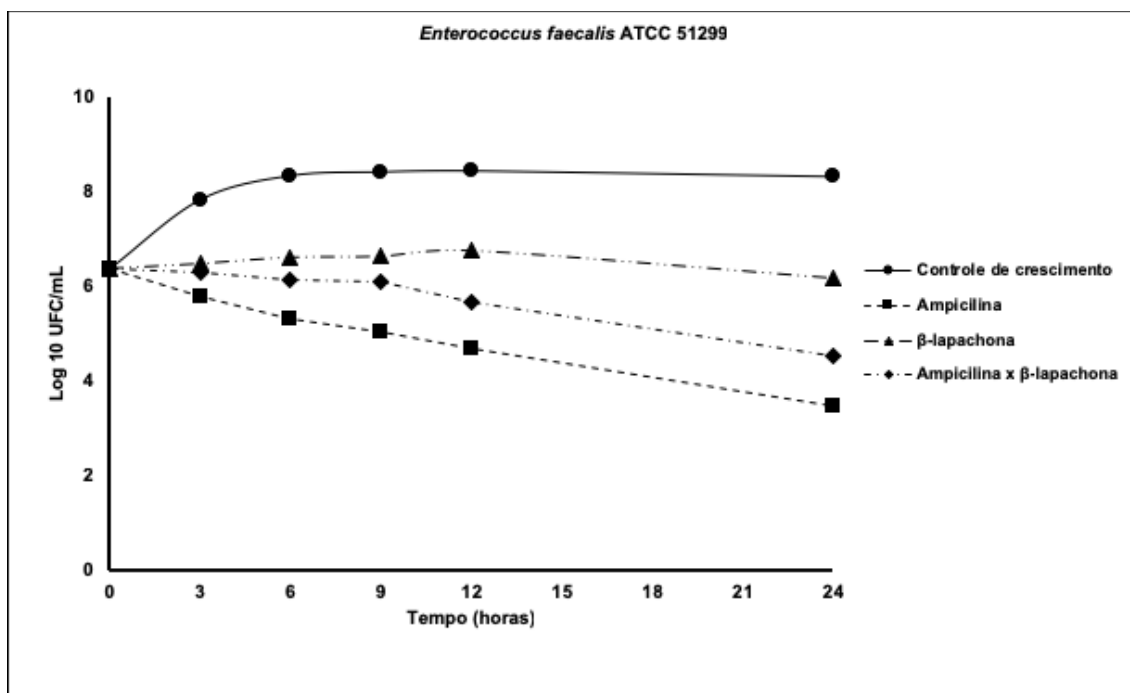
Fonte: O autor.

Figura 29 – Efeito da associação Gentamicina/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações inibitórias, frente a *E. faecalis* ATCC 51299



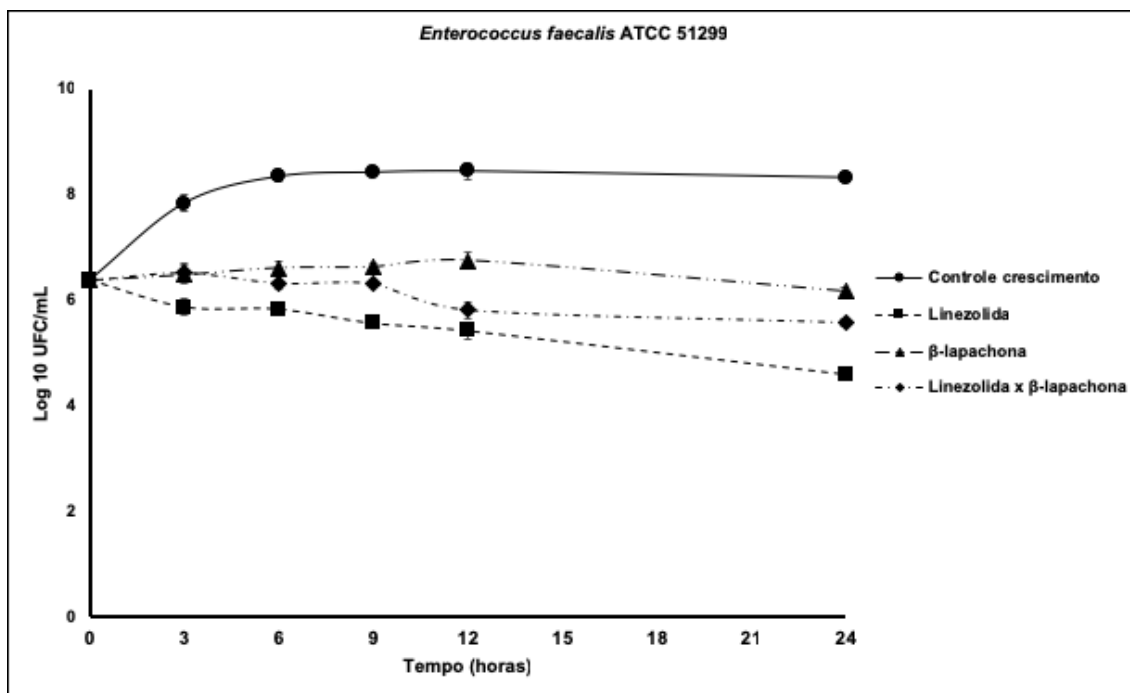
Fonte: O autor.

Figura 30 – Efeito da associação Ampicilina/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações inibitórias, frente a *E. faecalis* ATCC 51299



Fonte: O autor.

Figura 31 – Efeito da associação Linezolida/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações inibitórias, frente a *E. faecalis* ATCC 51299

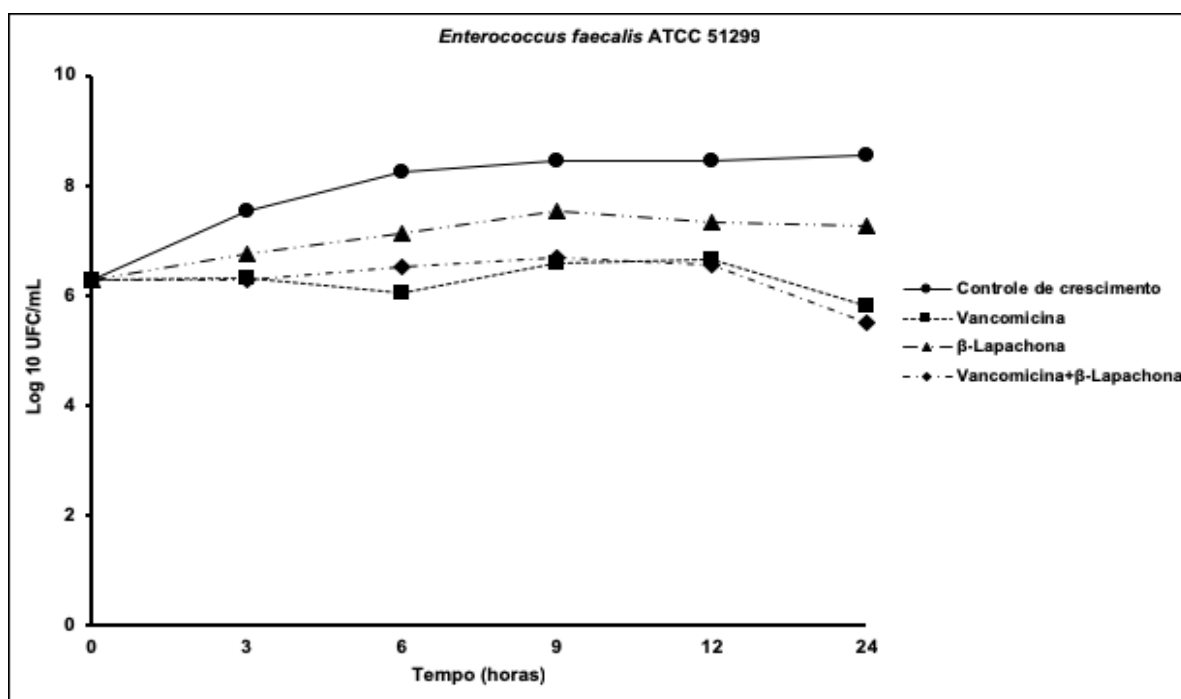


Fonte: O autor.

As figuras 32, 33, 34 e 35, apresentam a cinética de morte de *E. faecalis* após exposição a vancomicina, gentamicina, ampicilina, linezolida e β -Lapachona e associações em suas respectivas concentrações subinibitórias ($1/2$ CIM), ao longo das 24 horas.

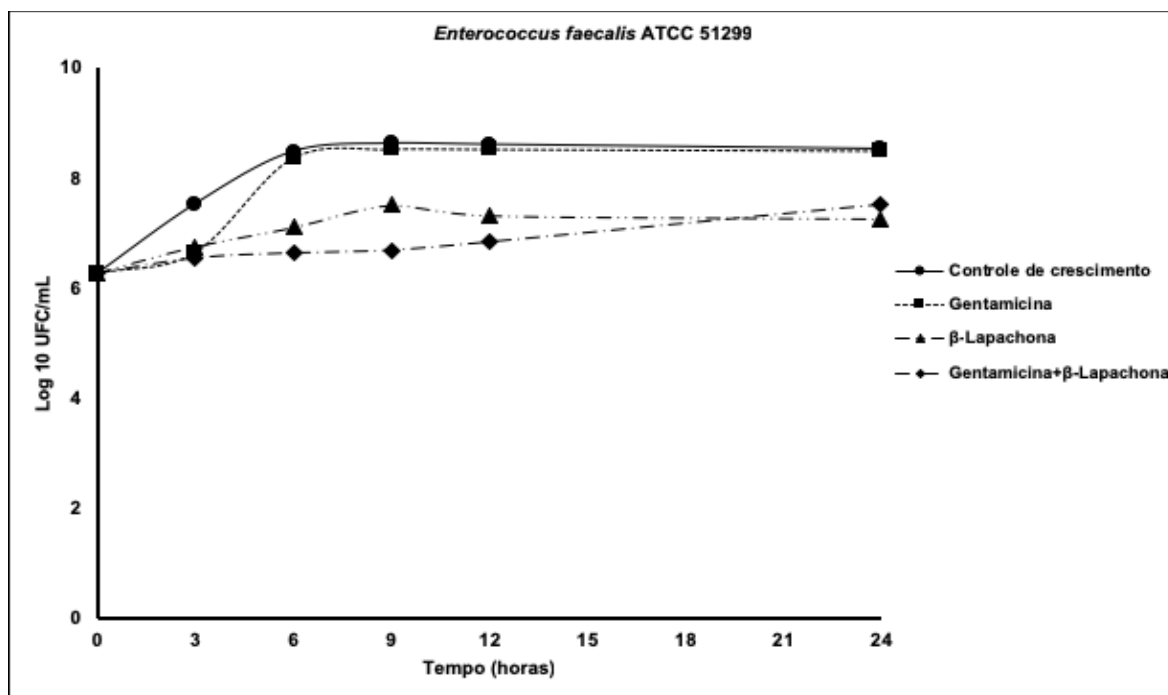
A inibição do crescimento da população bacteriana é discreta e apenas visualizada após 24 horas, com redução de $0,76 \log_{10}$, $0,96 \log_{10}$ e $0,99 \log_{10}$ após exposição com β -Lapachona associada à vancomicina, ampicilina e linezolida, respectivamente. A associação gentamicina/ β -Lapachona não inibiu o crescimento quando comparada com o inóculo inicial. Como observado nos resultados após exposição de *E. faecalis* as associações nas respectivas concentrações inibitórias, os efeitos da inibição em concentrações subinibitórias foi semelhante para as associações ativas.

Figura 32 – Efeito da associação vancomicina/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações subinibitórias ($1/2$ CIM), frente a *E. faecalis* ATCC 51299



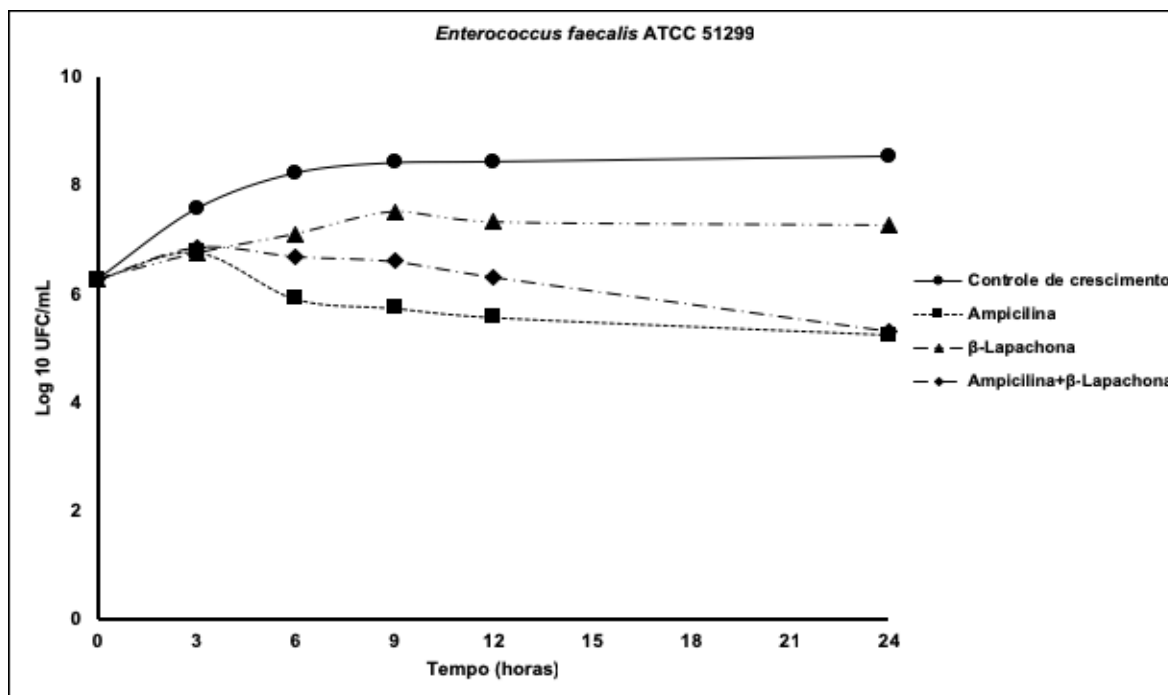
Fonte: O autor.

Figura 33 – Efeito da associação gentamicina/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações subinibitórias ($1/2$ CIM), frente a *E. faecalis* ATCC 51299



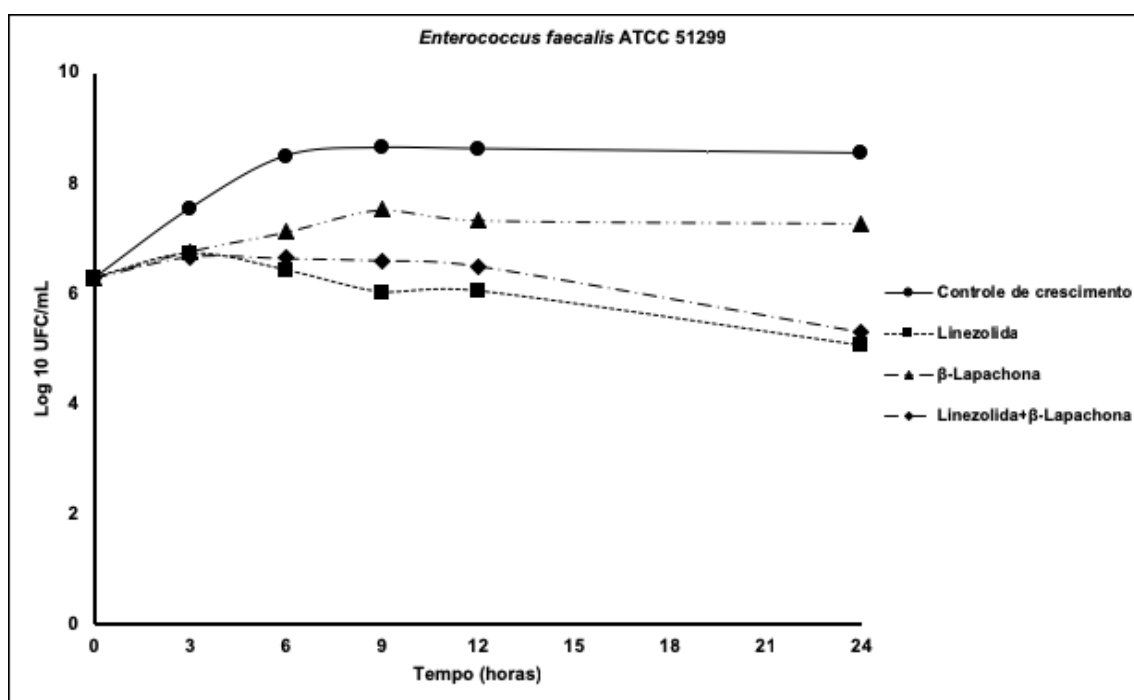
Fonte: O autor.

Figura 34 – Efeito da associação ampicilina/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações subinibitórias ($1/2$ CIM), frente a *E. faecalis* ATCC 51299



Fonte: O autor.

Figura 35 – Efeito da associação linezolida/ β -Lapachona, nas respectivas concentrações subinibitórias ($1/2$ CIM), frente a *E. faecalis* ATCC 51299



Fonte: O autor.

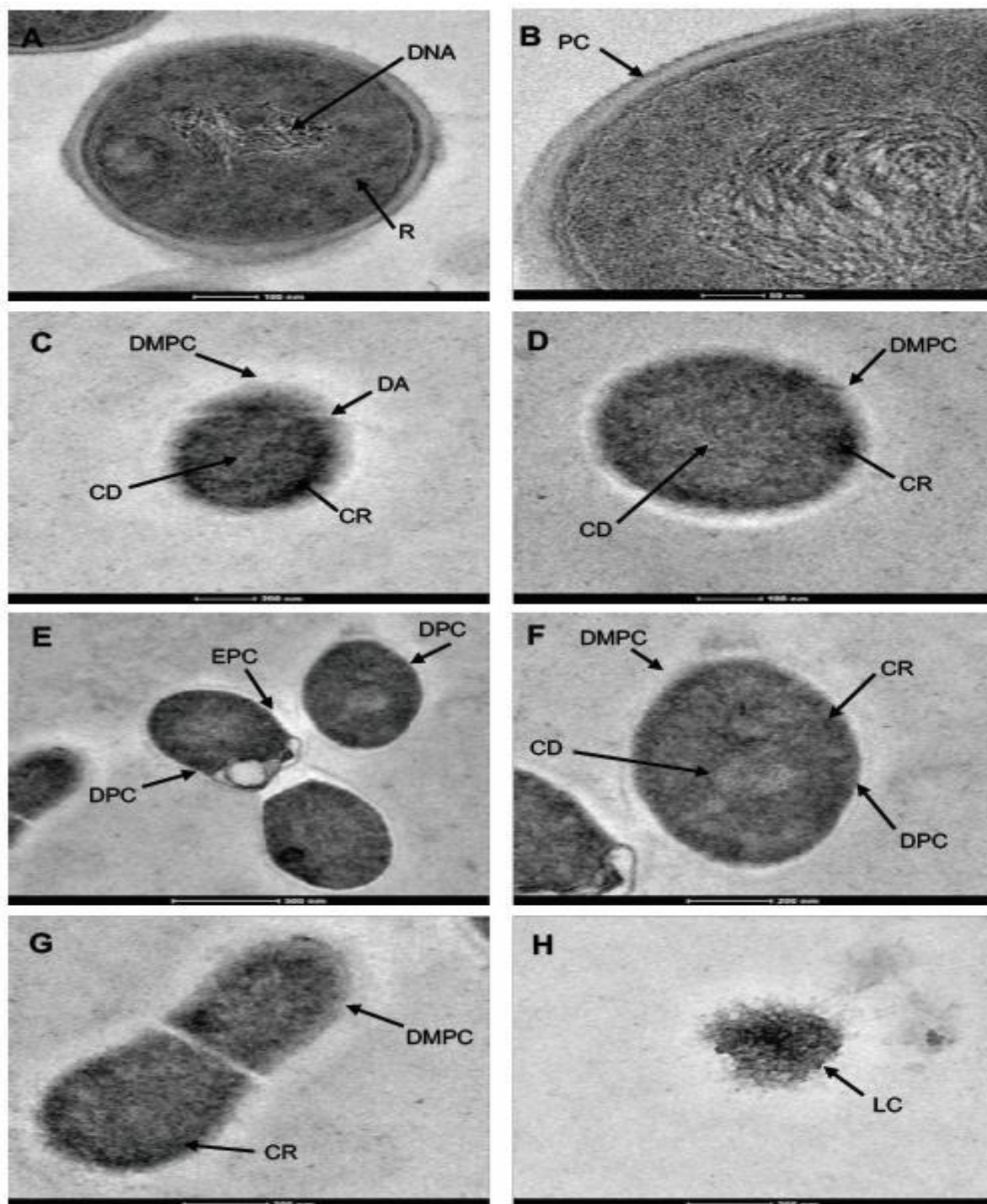
5.3.1 Alterações ultraestruturais

As alterações celulares observadas pela exposição por 24 horas da cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 à associação vancomicina/ β -Lapachona estão representadas na figura 36.

Figuras A, B, mostram células redondas medindo cerca de $0,6 \mu\text{m}$; membrana e parede celular preservadas; citoplasma contendo ribossomos distribuídos uniformemente e material genético ao centro.

Quando comparada ao controle, a associação vancomicina/ β -Lapachona foi capaz de induzir alterações morfológicas e fisiológicas, como por exemplo: alongamento celular (figuras E, G); divisões anômalas (figura C); condensação dos ribossomos (figuras C, D, F e G); deslocamento da parede celular (figuras E, F); desaparecimento da membrana e parede celulares (figuras C, D, F e G) e lise celular (figura H).

Figura 36 – Imagens da microscopia eletrônica por transmissão da cepa padrão de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 tratada com a associação β -Lapachona/vancomicina nas respectivas CIM



Células não tratadas (A – B) mostram parede celular (PC), Ribossomos (R) e DNA bacteriano (DNA). Células tratadas com a associação β -Lapachona/vancomicina (C – H) Desaparecimento da membrana e parede celular (DMPC), divisão anômalas (DA), condensação de ribossomos (CR), condensação do DNA (CD), descolamento da parede celular (DPC), alongamento celular (AC) e lise celular (LC).

Fonte: O autor.

5.4 BIOFILME

5.4.1 Produção de biofilme

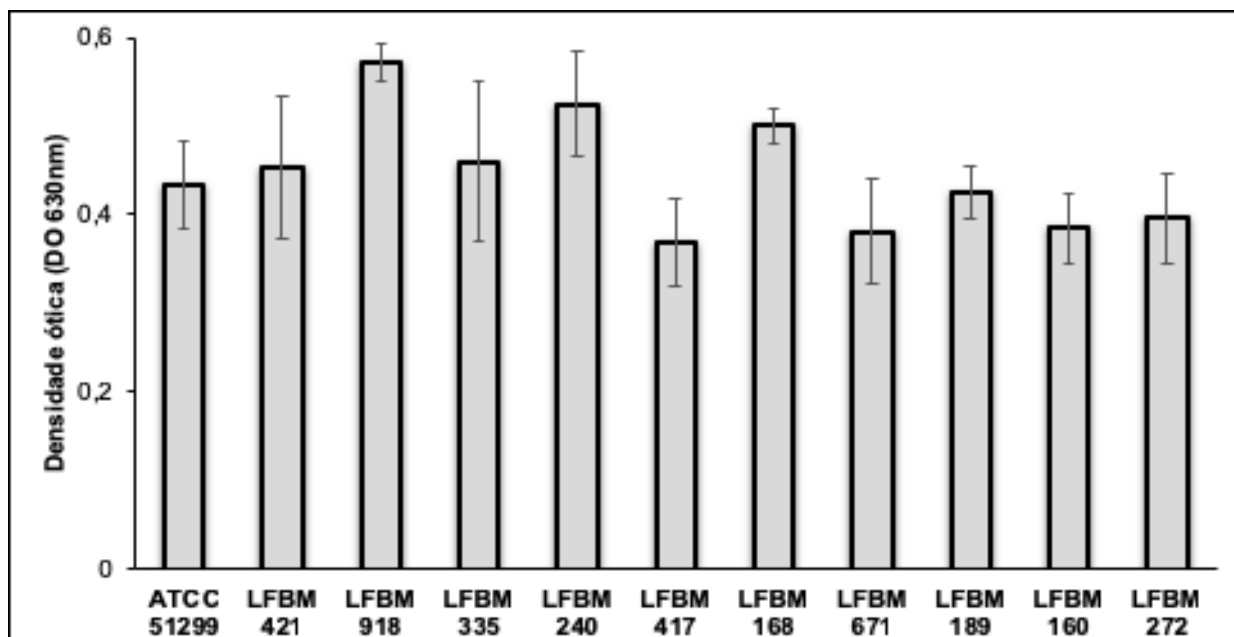
Todas as cepas de *E. faecalis* cresceram com aspecto enegrecido quando semeadas no ágar vermelho congo (figura 37). A quantificação do biofilme formado corroborou com o método fenótipo onde todas as cepas foram consideradas produtoras de biofilme (figura 38), e, seguindo os critérios de classificação descritos por Stepanovic *et al* (2000) foram consideradas moderadamente aderentes com densidades óticas variando entre 0,369 e 0,572.

Figura 37 – Produção de biofilme pelo método de ágar vermelho congo



Fonte: O autor.

Figura 38 – Avaliação da produção de biofilme pelo método da microplaca



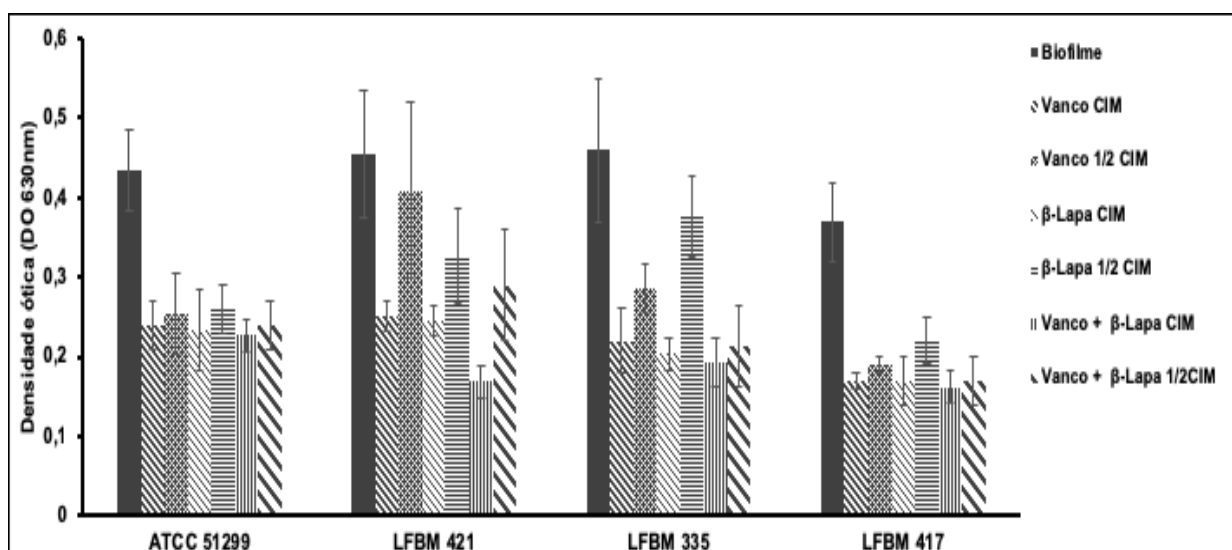
Fonte: O autor.

5.4.2 Determinação da atividade antibiofilme

Os resultados da atividade da vancomicina e β -Lapachona, e suas associações nas concentrações de CIM e 1/2 CIM, sobre a formação do biofilme de *E. faecalis*, estão apresentados na figura 39. De um modo geral, as drogas e sua associação foram capazes de inibir a formação do biofilme, porém nenhuma levou a sua completa inibição.

As drogas e sua associação foram capazes de inibir a formação do biofilme *E. faecalis* seja na CIM ou 1/2 CIM (figura 40). Esta inibição foi igual ou superior a 49% e quando comparadas ao controle (micro-organismo sem ter sido exposto a drogas ou associação) foram estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

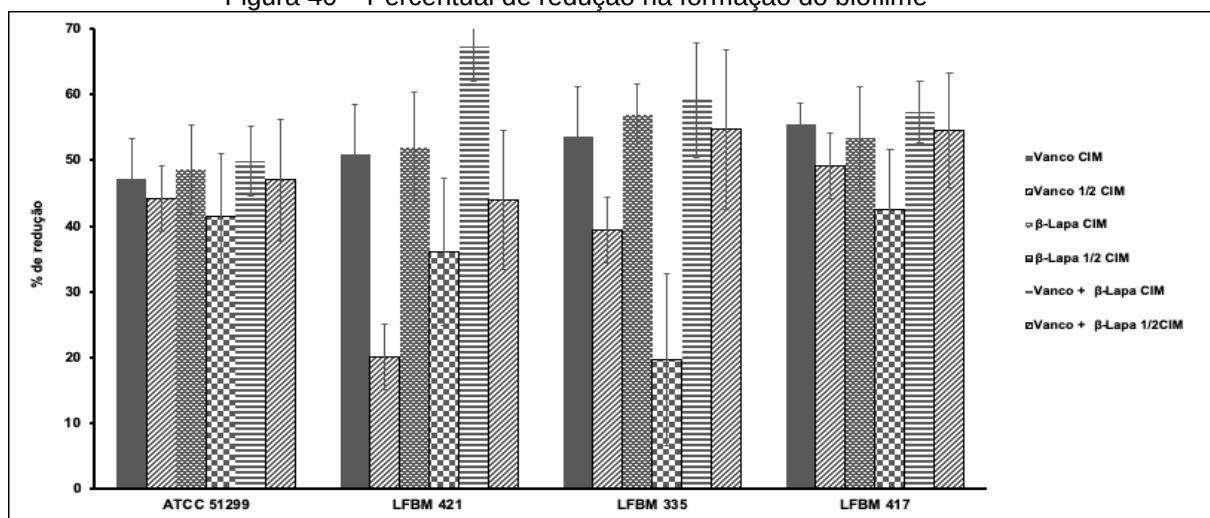
Figura 39 – Atividade antibiofilme de vancomicina e β -Lapachona isoladas e em associações



Vanco: vancomicina; β -Lapa: β -Lapachona; CIM: Concentração Inibitória Mínima

Fonte: O autor.

Figura 40 – Percentual de redução na formação do biofilme



Vanco: vancomicina; β -Lapa: β -Lapachona; CIM: Concentração Inibitória Mínima

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

As doenças infecciosas são causadas por micro-organismos, como as bactérias, e se manifestam devido a uma complexa interação entre patógeno, hospedeiro e meio ambiente. A descoberta de antibióticos erradicou a disseminação dessas doenças. No entanto, o uso indiscriminado levou ao desenvolvimento de agentes patogênicos multirresistentes (FARON; LEDEBOER; BUCHAN, 2016).

Na última década, houve um aumento dramático tanto na proporção como no número absoluto de patógenos bacterianos que apresentam resistência a múltiplas drogas a agentes antibacterianos. Dessa forma, a resistência antimicrobiana tornou-se uma ameaça global à saúde (ROCA *et al*, 2015).

O tratamento de infecções por *E. faecalis* é um desafio uma vez que são micro-organismos intrinsicamente resistentes a vários antimicrobianos, como β -lactâmicos e aminoglicosídeos, e podem adquirir resistência a outras classes, como quinolonas, tetraciclinas e glicopeptídeos. Nesses casos, podem servir como reservatório para a transmissão dos fatores de resistência a outros micro-organismos (LEAVIS *et al*, 2007; FARON; LEDEBOER; BUCHAN, 2016).

Em casos de infecções por *E. faecalis* a escolha da terapia é feita através da utilização de glicopeptídeos ou associações destes com aminoglicosídeos, geralmente, gentamicina. No entanto, o aumento de casos de cepas resistentes a estas classes de antimicrobianos tornou-se uma preocupação frequente, uma vez que a vancomicina é considerada a última alternativa para tratamento de infecções relacionadas com a assistência à saúde (WOODFORD; LIVERMORE, 2009; RIBOLDI *et al*, 2009).

Vega e Dowzicky (2017), relataram que o elevado índice de cepas do gênero *Enterococcus*, na América Latina, resistente a vancomicina. Das 576 cepas de *E. faecium* isoladas na América Latina entre 2004 e 2015, a resistência à vancomicina foi observada em 40,8%. As taxas de resistência à vancomicina entre isolados de *E. faecium* foram mais altas nos países como: Brasil (77,3%), Chile (55,9%) e Argentina (52,2%).

Quanto a *E. faecalis* das cepas isoladas entre 2004 e 2015, 1,6% expressaram resistência à vancomicina. O percentual foi menor que 2,5% em todos os países, com exceção do Brasil, que apresentou resistência a vancomicina em 14,3% dos isolados (VEGA; DOWZICKY, 2017).

O perfil de susceptibilidade das cepas de *E. faecalis* oriundas de hemoculturas, utilizadas neste estudo corroboram com os dados encontrados na literatura, cujos isolados clínicos de *E. faecalis* que apresentam resistência a glicopeptídeos, β -lactâmicos e aminoglicosídeos (BENDER *et al*, 2010; MEDELL *et al*, 2014; VEGA; DOWZICKY, 2017).

O alto índice de resistência a gentamicina e a linezolida em isolados de *E. faecalis* resistentes a vancomicina, como relatado neste estudo, corrobora com Jahansepar *et al* (2018) que relata uma taxa de 63,33% e 46,67% de resistência dos isolados a gentamicina e linezolida, respectivamente. Cepas de *Enterococcus* resistente a linezolida como descrito neste estudo foram relatadas anteriormente na América Latina (SADER *et al*, 2016).

O elevado índice de resistência a ampicilina encontrado neste estudo, também foi descrito por Matsumura *et al* (2018) que relata uma taxa de 87 % de cepas de *Enterococcus* resistentes à ampicilina em casos de bacteremias nosocomiais.

O elevado perfil de resistência apresentado por *E. faecalis*, a maioria das classes de antimicrobianos, é um desafio para os clínicos na terapia das infecções causadas por estes micro-organismos. Dessa forma, a pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas e/ou associações terapêuticas eficazes, que auxiliem no combate dessas infecções cujo tratamento é muito limitado e se faz necessário e é de extrema urgência (PALANIAPPAN; HOLLEY, 2010; VAN HARTEN *et al*, 2017; CALONICO *et al*, 2018).

As plantas medicinais são ferramentas valiosas para a indústria farmacêutica no desenvolvimento de novas moléculas candidatas a fármacos. Estima-se que um terço dos medicamentos são derivados diretamente de fontes naturais-moléculas isoladas, sintetizadas ou semi-sintetizadas por modificação estrutural de seus compostos (ULRICH-MERZENICH, 2014). Assim, plantas e seus metabolitos secundários são uma fonte promissora para o isolamento de compostos bioativos, incluindo os antimicrobianos (COWAN, 1999).

Naftoquinonas são uma classe de metabolitos secundários amplamente encontrados em plantas superiores, micro-organismos e em alguns animais (FERREIRA *et al*, 2010). Essa classe de compostos suscitou interesses crescentes em pesquisadores de todo mundo devido à sua grande diversidade estrutural. Uma variedade de naftoquinonas ocorrem naturalmente, como lapachol, α -lapachone, β -

lapachone, juglone e publagina e uma ampla gama de atividades biológicas dessas substâncias foram pesquisadas (WINK *et al*, 2012; KUMAGAI *et al*, 2012; FERREIRA *et al*, 2010).

De maneira geral, os compostos derivados de 1,4-naftoquinonas são mais ativos que aqueles 1,2-naftoquinonas frente às bactérias Gram positivas como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* (FERREIRA *et al*, 2004; TRAN *et al*, 2004). Assim, estudos sobre a atividade antienterocócica do lapachol e moléculas análogas foram descritos por Lima (1972), Nagata *et al* (1998) e Souza *et al* (2015). Três moléculas derivadas de Nor- β -lapachona obtidos por Lourenço *et al* (2011) apresentaram atividade antimicrobiana frente a isolados clínicos de *E. faecalis*.

A maioria dos metabólitos secundários oriundos de plantas apresentam fraca atividade antimicrobiana. Porém, são capazes de combater infecções fúngicas e bacterianas. Dessa forma, supõe que as plantas adotam mecanismos de sinergia entre seus compostos bioativos (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

A elucidação dos mecanismos de ação de agentes com potencial farmacológico quer sejam de origem natural ou sintética, contribui para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas racionais, particularmente em termos de infecções causadas por micro-organismos resistentes, que frequentemente requerem combinações de fármacos ou a utilização de novos fármacos quando o agente de primeira escolha não é eficaz (CASTRO *et al*, 2015).

As naftoquinonas aumentam a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) que danificam lipídios, proteínas e ácidos desoxirribonucleicos. Eles também são conhecidos por ocasionar a inativação de proteínas através da formação de complexos irreversíveis com aminoácidos. Possíveis alvos nas células microbianas são adesinas expostas na superfície, polipeptídeos de parede celular e enzimas ligadas à membrana da célula microbiana (COWAN, 1999).

Em estudo sobre o mecanismo de ação das naftoquinonas, Pereira *et al* (2006) mostraram que a síntese proteica por bactérias não foi inibida por várias naftoquinonas incluindo β -Lapachona. No entanto, foi observado o aumento nos níveis de algumas proteínas com peso de 100, 70, 60 e 10kDa. Este aumento está associado ao estresse oxidativo induzido por estas moléculas sobre as bactérias. Naftoquinonas podem competir com a ubiquinona, presente na cadeia

transportadora de elétrons, afetando a síntese de ATP (LAPORT *et al*, 2000; MACEDO *et al*, 2013).

O sinergismo entre antimicrobianos é uma metodologia bem estabelecida e vem sendo utilizada como um recurso adjuvante ao tratamento das infecções provocadas por micro-organismos que apresentam resistência ao tratamento convencional e, dessa forma, representam problemas terapêuticos para pacientes e centros de assistência à saúde, como no caso de *Enterococcus faecalis* (COURVALIN, 1985; ALIGHOLI *et al*, 2011).

Isolados clínicos de *Enterococcus faecalis* com elevados níveis de resistência a múltiplas drogas vem sendo relatados (SPERA; FARBER, 1992; ARIAS; MURRAY, 2012; NIEBEL *et al*, 2015; CALONICO *et al*, 2018) o que torna necessário a busca de novas terapias. Diante deste cenário, as associações entre drogas surgem como uma alternativa para conter a disseminação da resistência entre os patógenos.

A atual terapêutica para o tratamento de *Enterococcus spp.* multidroga resistente consiste na utilização de um inibidor da parede celular, como por exemplo β -lactâmicos ou glicopeptídeos, associados aos aminoglicosídeos (inibidores da síntese proteica). Esta associação permite a ação do aminoglicosídeo de forma mais eficaz do que quando utilizado isoladamente. No entanto, o aumento da resistência dos *Enterococcus spp.* a estes antimicrobianos mostrou também uma ineficácia quando em associações (MOELLERING JUNIOR *et al*, 1971; ALIGHOLI *et al*, 2011).

O *Checkerboard* (método do tabuleiro de xadrez) tem como princípio a avaliação da atividade de inibição da associação de agentes antimicrobianos em concentrações específicas em um determinado tempo fixo (PILLAI *et al*, 2005; MITCHELL *et al*, 2012).

No presente estudo, foi observado que as associações entre β -lapachona e glicopeptídeos, e β -lactâmicos, e aminoglicosídeos e fluorquinolonas foram sinérgicas e, portanto, capazes inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis* multidroga resistentes.

Micro-organismos resistentes a vancomicina, como no caso das cepas de *E. faecalis* deste estudo, modificam a produção de substâncias precursoras de pertideoglicano o que provoca uma fraca ligação ao antimicrobiano, inativando sua ação (ARTHUR; REYNOLDS; COURVALIN, 1996; EVERS; COURVALIN, 1996). A resistência intrínseca que os *Enterococcus spp.* possuem aos β -lactâmicos, se

estende a todos os grupos, e se dá por duas vias: pela presença de proteínas ligadoras de penicilina a superfície da membrana externa ou pela produção de β -lactamases, esta última, bem reportada para *E. faecalis* quando expostos a ampicilina (MURRAY, 1990).

Enterococcus spp. são intrinsecamente resistentes aos aminoglicosídeos, como a gentamicina, esse mecanismo se dá através da limitação do transporte da droga através da membrana celular. Os micro-organismos são capazes de mediar a resistência através da produção de enzimas, como: fosfotransferases (APHs), acetiltransferases (AACs) ou nucleotídltransferases (ANTs) que atuam modificando a molécula aminoglicosídica (CHOW, 2000; DEL CAMPO *et al*, 2000; KAK; CHOW, 2002).

A resistência a fluorquinolonas, como o ciprofloxacino, ocorre através da mutação de genes que codificam a síntese de enzimas como a DNA-girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV (SANDERS, 2001; ONODERA *et al*, 2002). A escolha de monoterapias com essa classe de antimicrobianos para o tratamento de infecções enterococcicas não é preconizada, devido à elevada possibilidade para o surgimento de resistência (ALÓS, 2003).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela β -lapachona, é um mecanismo bem reportado, que ocasiona a formação de superóxido ($O_2^{\bullet-}$), dotado de baixa capacidade oxidativa, e de peróxido de hidrogênio (CRUZ *et al*, 1978, BULATOVIC *et al*, 2002, SALAS *et al*, 2008).

No caso da célula bacteriana, estas EROs exercem sua citotoxicidade causando danos de natureza proteica e lipídica. Quando associada a antimicrobianos com alvo de ação na parede celular, as EROs podem atuar através da formação de complexos irreversíveis com aminoácidos precursores de peptídeos, formadores de parede celular. A ação da β -lapachona pode se dar também pela inativação de enzimas presentes na membrana da célula bacteriana, como no caso das β -lactamases (COWAN, 1999).

Antimicrobianos com ação na síntese proteica (gentamicina) ou no DNA cromossômico bacteriano (ciprofloxacino) podem ter sua ação estendida através do caráter eletrofílico que desencadeia reações com grupos tióis das proteínas (MCKALLIP *et al*, 2010) bem como, a inibição de topoisomerasas, como por exemplo a DNA-girase (O'BRIEN, 1991; FERREIRA *et al*, 2010). No entanto, Frydman *et al*

(1997) descreveram uma fraca inibição da DNA-girase, sendo uma reação que tem como produtos, complexos reversíveis. Quando associada à fluoquinolonas, a β -lapachona demonstrou atividade inferior quando comparada aos demais antimicrobianos.

Os danos celulares naturalmente desencadeados pelas EROs pode ser a causa da potencialização da ação dos antimicrobianos utilizados nas associações, através da inativação de mecanismos de resistência produzidos por *E. faecalis*.

Os resultados da atividade antienterocócica das associações β -lapachona/antimicrobianos obtidos no presente trabalho são inéditos. Quando comparado os resultados obtidos com estudos semelhantes utilizando associações de naftoquinonas frente a outros micro-organismos Gram positivos, observam-se efeitos semelhantes.

Macedo *et al* (2013) demonstraram atividade sinérgica da β -lapachona em combinação com agentes antimicrobianos frente à *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes, e apresentaram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo, com a inibição de cepas de *S. aureus* metilicina resistentes quando associada a β -lapachona a ampicilina e ciprofloxacino.

O efeito da associação entre metabólitos secundários de plantas ou moléculas sintetizadas a partir destes a antimicrobianos é uma área de impulso na pesquisa fitomédica com boa perspectiva para o desenvolvimento de medicamentos ou novas terapêuticas. Devido ao aumento da prevalência de micro-organismos multirresistentes os testes de sinergismo usando combinações de fitoquímicos com agentes antimicrobianos apresenta-se como uma ferramenta poderosa para selecionar novas terapias antimicrobiana mais eficazes e menos tóxicas aos pacientes (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Devido à resistência intrínseca e tolerância dos *Enterococcus spp.* aos agentes antimicrobianos, em especial os que inibem a síntese da parede celular, a terapia associada com drogas que sejam efetivas a nível de parede é o tratamento mais efetivo para infecções enterocóccicas, como endocardite e meningite, que requerem terapia bactericida (ALIGHOLI *et al*, 2011).

O surgimento de cepas de *Enterococcus spp.* com resistência concomitante aos antibióticos usados como terapias padrão para infecções enterocóccicas graves, bem como a ausência de atividade sinérgica com combinações desses agentes

antimicrobianos, é preocupante (ALIGHOLI *et al*, 2011). Diante deste problema, vários estudos têm avaliado a atividade antibacteriana através da cinética de morte, buscando novas terapias que sejam eficazes sobre estes micro-organismos.

No tratamento clínico, a associação de drogas é frequentemente utilizada na terapia de infecções graves acometidos por micro-organismos que apresentam elevada resistência aos protocolos clínicos convencionais baseados na utilização de antimicrobianos isolados ou em casos de infecções polimicrobianas. No caso dos *Enterococcus spp.*, o principal objetivo das associações é evitar o surgimento de mutantes resistentes e obter um efeito sinérgico, ou seja, uma atividade maior ou mais rápida, permitindo que a dose seja ajustada e possivelmente reduzir a duração do tratamento e, assim, os efeitos tóxicos a longo prazo na administração.

As infecções enterocócicas, como endocardites, são frequentemente tratadas com dois antibióticos, o que resulta em maiores chances na efetividade do tratamento. A combinação terapêutica geralmente inclui uma droga que atue e modifique a arquitetura da parede celular e possibilite um aumento na permeabilidade de outras moléculas e uma droga que atue em outros sítios de ação como ribossomos ou a molécula de DNA (MOELLERING JUNIOR; WENNERSTEN; WEINBERG, 1971; RYAN; KWASNIK; TILTON, 1981; ARIAS *et al*, 2007).

Métodos que avaliam, de forma estática, a atividade antimicrobiana das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas não são suficientes para prever a atividade de uma substância com potencial antimicrobiano. Dessa forma, com bases nos resultados obtidos anteriormente pelo *Checkerboard*, achou-se necessário, acompanhar a atividade também pelo método da cinética de morte (*time kill*), onde a dinâmica da atividade dos antimicrobianos tomados isoladamente ou em associações é avaliada comparando-se a redução do número de bactérias por um determinado período de tempo.

Os resultados obtidos pelas associações β -lapachona/antimicrobianos pelo método "*time kill*", demonstraram inibição do crescimento como observado pelo método "*Checkerboard*", nas mesmas associações avaliadas neste estudo.

Estudos da avaliação da cinética de morte com 1,4-naftoquinonas frente a *E. faecalis* até o momento, não foram reportados por outros estudos. No entanto, Silva *et al* (2009) reportaram a atividade bactericida da associação β -lapachona/isoniazida, frente a *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium smegmatis*.

Atividade fungistática de derivados de 1,4-naftoquinonas frente a *C. tropicalis* foi descrita por Wittebolle *et al* (2006).

A produção de EROs pela β -lapachona pode induzir o aparecimento de danos a vários componentes celulares, como pode ser visualizado nas imagens da MET. No caso das proteínas, pode ocorrer modificações oxidativas diretas em cadeias laterais e por clivagem de peptídeos mediada por EROs que também estendem sua ação sobre as membranas lipídicas. A peroxidação lipídica produz radicais orgânicos que propagam as reações de peroxidação que resulta em alterações substanciais à célula. Tal evento diminui a fluidez das membranas biológicas e aumentam a sua permeabilidade com consequente indução de morte celular. Estas alterações justificam os danos observados em nível de parede, membrana celular e conteúdo citoplasmático (MOREL *et al*, 1990; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1993; HENSLEY *et al*, 2000).

Quanto ao desaparecimento da membrana e parede celular, supõe-se ser decorrente da ação de enzimas da bactéria, denominadas de autolisinas, que estão presentes entre as moléculas de peptidoglicano, e que promovem a inserção de novas moléculas. Assim, quando os micro-organismos são expostos a antimicrobianos com alvo de ação na síntese da parede celular, essas moléculas podem não serem inseridas. Dessa forma, a ocorrência de falhas na parede celular se dá pela não inserção de novo monômeros a extremidade crescente da parede celular pelas enzimas transglicosidase e transpeptidase (SANTHANA, 2007).

O estresse oxidativo induzido pela β -Lapachona quando associado à inibição da síntese da parede celular provocado pela vancomicina, podem danificar a integridade dessa membrana celular, através da peroxidação lipídica resultando na destruição de fosfolipídios (SIQUEIRA JUNIOR *et al*, 1999; MACHADO *et al*, 2011).

As alterações observadas na estrutura da parede celular podem ser provocadas pelo movimento da molécula de água a partir do ambiente externo para a região intracelular. A diferença de pressão osmótica entre os dois ambientes é um dos fatores para o surgimento dessas alterações, que pode levar a lise da célula bacteriana (SCHITTO, 2006). Mecanismos desenvolvidos para manutenção da pressão osmótica são responsáveis pelo espessamento da parede e a condensação dos ribossomos (SANTHANA, 2007).

Danos intracelulares tais como, a condensação de ácidos nucleicos pode sugerir a expressão de possíveis efeitos sobre a função de topoisomerases, como a

DNA-girase, que é uma das vias de ação de naftoquinonas sobre a célula bacteriana (HILLARD *et al*, 2008; CASTRO; PINTO, 2009). A enzima é imobilizada e passa a não atuar na replicação do DNA através da manutenção da integridade e topologia do DNA bacteriano. A girase primariamente introduz superenovelamento negativo no DNA, função essencial para a replicação e transcrição desta molécula (PAPILLON *et al*, 2013).

Quando a β -lapachona é associada aos antimicrobianos, esses efeitos são potencializados, através da atuação dessas moléculas em outros alvos celulares, como por exemplo, as enzimas. No entanto, a potencialização dos efeitos das drogas quando associadas ainda não foi capaz de levar a morte celular da cepa após exposição a essas moléculas.

É relevante ressaltar que o efeito bactericida ou bacteriostático que essas associações possam causar está relacionado não só ao tempo de exposição, a concentração de cada produto como também, as características fenotípicas do micro-organismo em estudo (CATÃO *et al*, 2006).

Portanto, é esperado que as concentrações das drogas, usadas nos estudos de cinética de morte, com base na CIM obtida após análise de ICIF, tenham um efeito sobre o crescimento bacteriano. Embora a sinergia detectada por estudos inqueridos *in vitro* não possam em algumas situações serem confirmadas por análise cinética, a falta de antagonismo observada com as associações em ambos os estudos é um resultado encorajador sugerindo que essas drogas possam revelar-se eficazes em terapia combinada frente à célula enterococcica (RAND *et al*, 1993; PETERSEN *et al*, 2006).

Enterococcus faecalis compreende uma média de 80% dos isolados clínicos de *enterococos*, e é um dos patógenos hospitalares mais comum nas últimas três décadas (CETINKAYA *et al*, 2000; EMANEINI *et al*, 2005; RUDY *et al*, 2005).

Um mecanismo importante no processo de infecção por *Enterococcus spp.* é a adesão do micro-organismo a superfícies e o desenvolvimento de comunidades multicelulares, biofilmes (DONLAN, 2002; LEE, 2017). A formação de biofilme, é um fator importante na transmissão de elementos genéticos, como plasmídeos, que são elementos determinantes na resistência a antimicrobianos (NALLAPAREDDY *et al*, 2008; STRATEVA *et al*, 2016).

No presente estudo, o ágar vermelho congo modificado e o método da microplaca foram técnicas utilizadas para a detecção de produção de biofilme

emisolados de *E. faecalis*. Os resultados obtidos pelos dois métodos foram semelhantes para detecção da formação de biofilme. No entanto, o método da microplaca é mais preciso por ser possível a quantificação da produção de biofilme pelos enterococos, enquanto o ágar vermelho congo apenas identifica fenotipicamente a produção (FALLAH *et al*, 2017).

Todas as cepas de *E. faecalis* vancomicina resistentes, utilizadas neste estudo foram produtoras de biofilmes. Sandoe *et al* (2003), em um trabalho realizado no Reino Unido com cepas de *E. faecalis* isoladas de hemoculturas, também observaram a produção de biofilme em todas as cepas. Cormelato *et al* (2013), detectaram 85% dos isolados resistentes a vancomicina, como produtoras de biofilme. Segundo Mohamed (2004) *E. faecalis* produz biofilme com mais frequência que *E. faecium* sendo considerando um fator importante na patogênese da infecção.

A frequência na formação de biofilme é maior entre as cepas isoladas de infecção e colonização do que das cepas de origem ambiental. Esta variação na faixa de produção de biofilme pode ser atribuída à diferença na fonte original dos isolados (SOLTANI *et al*, 2018). Como a formação do biofilme pode ser um processo multifatorial, o elo exato na associação entre os fatores de virulência com a formação de biofilme é difícil de determinar, estudos sugerem que fatores ambientais e fatores genéticos podem estar associados à produção de biofilme (MOHAMED; HUANG, 2007; COMERLATO *et al*, 2013).

A atuação de genes responsáveis pela patogenicidade em *E. faecalis* na formação da matriz do biofilme é bem descrita em estudos (FALLAH *et al*, 2017; SAFFARI *et al*, 2017). Dentre os genes envolvidos na formação do biofilme os mais descritos são, substância de agregação (*agg*), adesão ao colágeno (*ace*), citolisina (*cyl*), antígeno associado a endocardites (*efa*), sistema de regulação *quorum sensing* (*fsr*), gelatinase (*gelE*) e proteínas de superfície extracelular (*esp*) (HANCOCK; PEREGO, 2004; LENZ; HEW-FERSTL; VOGEL, 2010; HASHEM *et al*, 2017).

A adesão é o primeiro passo na colonização bacteriana e na formação de biofilme. Genes *efa* e *ace* codificam proteínas de superfície relacionadas à adesão com características de uma adesina bacteriana, o *gelE* produz proteases extracelulares e é regulado por *fsr*, e o gene *esp* é crítico para a formação de biofilme pelo seu produto, uma proteína da superfície celular (HANCOCK; PEREGO, 2004; HASHEM *et al*, 2017).

O sistema de *quorum sensing* (*fsr*) de *E. faecalis* tem mostrado regular a formação de biofilme através da produção de gelatinase (*gelE*). Modificações no *fsr* parece afetar tanto a ligação primária quanto o crescimento do biofilme. A gelatinase é um dos principais contribuintes para o desenvolvimento do biofilme, mas sua expressão requer o sistema regulatório codificado pelo *fsr*. O gene *esp*, que codifica um polissacarídeo extracelular, está localizado em uma ilha de patogenicidade e pode mediar a ligação primária da bactéria ao material inerte. Como também pode melhorar a aderência bacteriana aos tecidos bióticos (HANCOCK; PEREGO, 2004; TENDOLKAR *et al*, 2005; VAN; GILMORE, 2014).

Outro grupo de substâncias associadas à formação de biofilme são as sortases, enzimas transpeptidases ancoradas à membrana, são encontradas na maioria das bactérias Gram-positivas. Dentre as sortases, a enzima sortase A, relacionada com a adesão bacteriana, é considerada essencial para a sobrevivência de *E. faecalis*, e é um alvo para o tratamento de infecções associadas a estes micro-organismos (CASCIOFERRO *et al*, 2014; SELVARAJ *et al*, 2014).

Chen *et al* (2016) em estudo comparativo, observaram a presença da enzima sortase A em maior quantidade no biofilme que em células planctônicas. Guiton *et al* (2009) relataram que a deleção da sortase A afetou o estágio de inserção e resultou em uma deficiência na produção de biofilme, sugerindo que a sortase A está associada ao desenvolvimento inicial do biofilme em *E. faecalis*.

Vários mecanismos estão relacionados à elevada resistência biofilmes aos antimicrobianos. Pode-se mencionar, por exemplo, a lenta difusão da substância através do biofilme; alterações químicas no microambiente do biofilme; respostas adaptativas ao estresse; presença de uma pequena população de células tolerantes, entre outras (VAN ACKER; VAN DIJCK; COENYE, 2014; MORAES *et al*, 2018). Devido à alta prevalência de isolados clínicos de *Enterococcus spp.* multirresistentes, é urgente a busca por novas drogas que tenha como alvo a inibição da formação de biofilme (CHEN *et al*, 2016).

Os resultados da atividade antibiofilme da β -lapachona, isolada ou em associada a vancomicina frente a *E. faecalis*, obtidos nesse estudo, são inéditos. Dessa forma, a produção de EROs pelas naftoquinonas, substâncias responsáveis pela citotoxicidade através da indução de danos a moléculas proteicas bem como ao DNA (RAMOS-PÉREZ *et al*, 2014) é um mecanismo que pode atuar na inibição da formação da matriz do biofilme, através da capacidade que as EROs possuem de

inibir ação ou impedir a produção de proteínas codificadas pelo genes através de danos causados a molécula proteica.

As naftoquinonas podem atuar na molécula do DNA bacteriano, através da inibição de topoisomerasas e desencadear mutações ou suprimir a expressão dos genes e operons responsáveis pelo desenvolvimento e formação da matriz do biofilme.

Quando a β -lapachona foi associada à vancomicina, houve um aumento na inibição da formação do biofilme. Na literatura não há relatos publicados de inibição de biofilme pela vancomicina em *Enterococcus spp.* mas há um caso precedente relatado para um isolado de *Staphylococcus aureus* (CLEWELL *et al*, 2002). Hashem *et al* (2017) em estudo baseado na formação e inibição do biofilme correlacionando ao perfil de resistência a vancomicina, observou que cepas de *E. faecalis* sensíveis a vancomicina, quando em contato com o antimicrobiano, tem a inibição da formação do biofilme. No presente estudo, também foi observado à inibição da formação do biofilme quando as cepas foram expostas ao antimicrobiano, no entanto as cepas eram resistentes a vancomicina.

No entanto, Hashem *et al* (2017) sugerem que a vancomicina possa estar interagindo diretamente com a enzima gelatinase ou com qualquer regulador desta molécula. O estudo também relaciona uma segunda hipótese, que é a inibição pode estar relacionada à alteração de circuitos reguladores de genes em resposta ao estresse induzido pela vancomicina.

7 CONCLUSÃO

Nas últimas décadas, os *Enterococcus* se tornaram um dos problemas nosocomiais mais desafiadores devido principalmente a capacidade de resistir e sobreviver em condições ambientais adversas e, portanto, de colonizar diferentes nichos ecológicos e se disseminar na cadeia alimentar por animais e alimentos contaminados.

As cepas de *E. faecalis* isoladas de hemoculturas apresentaram perfil fenotípico de resistência a todas as classes de antimicrobianos testados. Sendo consideradas cepas multirresistente. As naftoquinonas testadas (Lapachol, α -Lapachona e β -Lapachona) apresentaram atividade inibitória e bactericida frente a todas as cepas testadas com valores de CIM entre 160-640 μ g/mL. Dentre as naftoquinonas testadas, a β -Lapachona mostrou-se mais ativa, incentivando a utilização de novas metodologias para determinar o espectro de ação desta molécula.

Efeitos sinérgicos resultantes da combinação de agentes antimicrobianos com naftoquinonas tem sido relatado em estudos com micro-organismos. Dados da literatura, bem como nossos resultados revelam o potencial da β -Lapachona para o tratamento terapêutico em associações. As associações antimicrobianas da β -Lapachona com vancomicina, ampicilina, gentamicina em concentrações subinibitórias apresentaram atividade sinérgica para todas as cepas de *E. faecalis* testadas. Associações entre β -Lapachona e ciprofloxacino, se mostraram sinérgicas e aditivas.

O efeito anti-enterococcico da β -Lapachona e o efeito sinérgico deste metabólito secundário em associação com os antimicrobianos beta-lactâmicos, fluoroquinolônicos e aminoglicosídeos e glicopeptídeos, pode ser uma alternativa viável para o tratamento de infecções enterococcicas.

Assim, o uso combinado de moléculas pertencentes a diferentes classes, com ação antimicrobiana, surge como um nova opção terapêutica para o tratamento de infecções como estas ocasionadas por *Enterococcus*.

As associações β -Lapachona/antimicrobianos foram capazes de inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299. Das associações testadas na CIM, foram consideradas mais ativas β -Lapachona/vancomicina e β -

Lapachona/gentamicina, com reduções de células viáveis do inóculo inicial de 1,57 log₁₀, 1,66 log₁₀, respectivamente.

Quando testadas em concentrações subinibitórias (1/2 CIM), as associações com β-Lapachona as quais foram visualizadas a inibição do crescimento bacteriana foram aquelas associadas à vancomicina, ampicilina e linezolida com redução de 0,76 log₁₀, 0,96 log₁₀ e 0,99 log₁₀, respectivamente. Portanto, a associação β-Lapachona/gentamicina não se mostrou ativa nestas concentrações.

Quando a cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 foi exposta a associação vancomicina/β-Lapachona nas CIMs, alterações e danos celulares foram observados pela microscopia eletrônica por transmissão. Essas alterações celulares demonstraram a ação antibacteriana da associação vancomicina/β-Lapachona frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 51299.

A produção de biofilme foi observada entre todas as cepas de *E. faecalis*. A β-lapachona isolada ou associada à vancomicina, foi capaz de inibir a formação de biofilme quando testadas em concentrações inibitórias e subinibitórias frente a cepas de *E. faecalis* resistentes a vancomicina.

A atividade antibiofilme da β-lapachona pode estar relacionada à inibição das moléculas responsáveis pela formação do biofilme, seja na produção ou função. Esta associação reforça a capacidade efetiva de ambos os compostos na modulação de um fator de virulência tão importante e refratário como o biofilme.

Embora os micro-organismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* não representem um problema para indivíduos imunocompetentes, é sempre necessário monitorar sua presença e reduzir sua oportunidade de disseminação principalmente em ambientes nosocomias, pois, conforme demonstrado por nossos resultados, a resistência a antibióticos aumentou acentuadamente nos últimos anos em espécies do gênero, como no caso de *E. faecalis*. Dessa forma, a identificação de novos antimicrobianos eficazes para o tratamento de infecções enterocócicas pode reduzir a difusão de espécies resistentes de *Enterococcus*.

REFERÊNCIAS

- ABERNA, R. *et al.* Evaluation for the association of virulence determinants among *E. faecalis* with its clinical outcome. **Int J Bio I Med Res**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 523-527, 2011.
- AKHTAR, Y. *et al.* Antifeedant and toxic effects of naturally occurring and synthetic quinones to the cabbage looper, *Trichoplusia*. **Crop Protection**, [s.l.], v.31, n. 1, p. 8-14, 2012.
- ALIGHOLI, M. *et al.* Time-kill study and synergistic activity of cell-wall inhibitor antibiotics in combination with gentamicin against *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, [s.l.], v. 58, n. 3, p. 219-226, 2011.
- ALÓS, J. I. Quinolonas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, [s.l.], v. 21, n. 5, p. 261-268, 2003.
- ANVISA. **Boletim Informativo**: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Avaliação dos indicadores nacionais de infecção relacionada à assistência a saúde (IRAS) e resistência microbiana. Ano de 2016 e relatório de progresso. nº 16. 2016. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancaadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-n-16-avaliacao-dos-indicadores-nacionais-das-infeccoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude-iras-e-resistencia-microbiana-do-ano-de-2016>. Acesso em: 03 Jan. 2019.
- APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P. A. The fluoroquinolone anti bacterial: past, present and future perspectives. **Int. J. Antimicrob. Ag**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 5-15, 2000.
- ARAÚJO, K. C. S.; MARCUCCI, M. C. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra *Enterococcus faecalis*. **Rev. Pesq. Inov.Farm**, [s.l.], v.3, n.1, p. 9-14, 2011.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance. **Nat Rev Microbiol**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 266-278, 2012.
- ARIAS, C. A. *et al.* Evaluation of ceftobiprole medocaril against *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, [s.l.], v. 60, n. 3, p. 594-598, 2007.
- ARNAUDON, M. Comptes Rendus Hebdomadaires. **Des Sianes ‘L ‘Acord. Des Science**, [s.l.], v. 46, n. 1, p. 1152-1858, 1858.
- ARTHUR, M.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. **Trends in microbiology**, [s.l.], v. 4, n. 10, p. 401-407, 1996.
- ASLAM, M. Characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. Recovered from a commercial beef processing plant. **Foodborne Pathogens disease**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.235-241, 2010.

BAIK, J. E. *et al.* Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety. **J Endod.** [s.l.], v. 37, n. 2, p. 191-196, 2011.

BAIK, J. E. *et al.* Lipoteichoic Acid Partially Contributes to the Inflammatory responses to *Enterococcus faecalis*. **Journal Endodontic**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 975-82, 2008.

BATISTÃO, D. W. D. F. *et al.* Risk factors for vancomycin-resistant enterococci colonisation in critically ill patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 107, n. 1, p. 57-63, 2012.

BARRY, A. L. *et al.* **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline.** NCCLS document M26-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1999.

BAUER, A. W. W. M *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

BEAUVOIR, Simone de. **Mémoires d'une jeune fille rangée.** Paris: Gallimard, 1958.

BEGANOVIC, M. *et al.* A Review of Combination Antimicrobial Therapy for *Enterococcus faecalis* Bloodstream Infections and Infective Endocarditis. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 67, n. 2, p. 303-309, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciy064>. Acesso em: 02 abr. 2019.

BELIZÁRIO, E. J. O próximo desafio reverter o câncer. **Ciência Hoje**, v. 184, n. 31, p. 50-57, 2002.

BENDER, E. A. *et al.* Avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus spp.* isolados em dois hospitais de Porto Alegre-RS, Brasil. **Rev. bras. anal. clin**, [s.l.], v. 42, n. 1, p. 15-19, 2010.

BI, R. *et al.* The emerging problem of linezolid-resistant enterococci. **Journal of global antimicrobial resistance**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 11-19, 2018.

BØHLE, L. A. *et al.* Identification of surface proteins in *Enterococcus faecalis* V583. **BMC genomics**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 135, 2011.

BOZDOGAN, B.; APPELBAUM, P. C. Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. **International journal of antimicrobial agents**, [s.l.], v. 23, n. 2, p. 113-119, 2004.

BROWN, D. F. J. *et al.* National glycopeptide-resistant enterococcal bacteraemia surveillance Working Group report to the Department of Health. **Hosp Infect**, [s.l.], v. 62, n. 1, p. 1-27, 2006.

BULATOVIC, V. M. *et al.* Oxidative stress increases susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s.l.], v. 46, n. 9, p. 2765-2771, 2002.

CALONICO, C. *et al.* Prevalence of Antibiotic Resistance in Enterococci: A 14 Year Survey. **Journal of Food and Nutrition Research**, [s.l.], v. 6, n. 10, p. 626-637, 2018.

CANTON, R.; RUIZ-GARBAJOSA, P. Infections caused by multi-resistant gram-positive bacteria (Staphylococcus aureus and Enterococcus spp. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, [s.l.], v. 31, n.8, p. 543-551, 2013.

CARLOS, A. R. *et al.* Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins. **Journal of applied microbiology**, [s.l.], v. 108, n. 5, p. 1563-1575, 2010.

CASCIOFERRO, S. *et al.* Domenico. Sortase A: an ideal target for anti-virulence drug development. **Microbial pathogenesis**, [s.l.], v. 77, n. 1, p. 105-112, 2014.

CASTRO, R. D. *et al.* Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against Candida species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 417-424, 2015.

CASTRO, S. L.; PINTO, A. V. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 4570-4590, 2009.

CATÃO, R. M. R. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de Staphylococcus aureus e Escherichia coli multirresistentes. **Rev. bras. anal. clin**, [s.l.], v. 37, n. 4, p. 247-249, 2006.

CAUWERTS, K. High prevalence of tetracycline resistance in Enterococcus isolates from broilers carrying the erm (B) gene. **Avian Pathology**, [s.l.], v. 36, n. 5, p. 395-399, 2007.

CETINKAYA Y. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci. **Clin Microbiol Rev**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 686-707, 2000.

CHEN, L. *et al.* The effect of berberine hydrochloride on Enterococcus faecalis biofilm formation and dispersion in vitro. **Microbiological research**, [s.l.], v. 186, n. 1, p. 44-51, 2016.

CHOW, J. W. Aminoglycoside resistance in enterococci. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 31, n. 2, p. 586-589, 2000.

CLEWELL, D. B. *et al.* Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the Staphylococcus aureus issue. **Plasmid**, [s.l.], v. 48, n. 3, p. 193-201, 2002.

COBURN, P. S. *et al.* The Enterococcus faecalis cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 10, p. 661-669, 2003.

COMERLATO, C. B. *et al.* Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 108, n. 5, p. 590-595, 2013.

COSTERTON, J. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 50-52, 2001. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01918-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01918-1). Acesso em: 16 mar. 2019.

COURVALIN, P. **L'antibiogramme**. Paris, France: Ed. MPC/Videom, 1985.

COX, C. R. *et al.* Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. **Current Protein and Peptide Science**, v. 6, n. 1, p. 77-84, 2005.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, [s.l.], v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRAIG, W. A. Antimicrobial resistance issues of the future. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, [s.l.], v. 25, n. 4, p. 213-217, 1995.

CRUZ, F. S. *et al.* Effect of beta-lapachone on hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 35, n. 1, p. 35, 1978.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/mmbr.00016-10>. Acesso em: 11 abr. 2019.

DEL CAMPO, R. *et al.* Aminoglycoside-modifying enzymes in high-level streptomycin and gentamicin resistant *Enterococcus* spp. in Spain. **International journal of antimicrobial agents**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. 221-226, 2000.

DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. **Clin Infect Dis**, [s.l.], v. 45, n. 1, p. 88-94, 2007.

DOMING, K. J. *et al.* Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. **Int J Food Microbiol**, [s.l.], v. 88, n. 1, p. 165-188, 2003.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, [s.l.], v. 8, n. 9, p. 881, 2002.

DRAGO, L. *et al.* *In vitro* evaluation of antibiotic combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infectious Disease**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 111, 2007.

DRLICA, K. *et al.* Quinolone-mediated bacterial death. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s.l.], v. 52, n. 2, p. 385-392, 2008.

DUPRE, I. *et al.* Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). **Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 6, p. 491-498, 2003.

DURANTE-MANGONI, E. *et al.* Do we still need the aminoglycosides?. International journal of antimicrobial agents, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 201-205, 2009.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. Antimicrobial combinations. *In*: LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 4. ed. Baltimore, MD: The Williams and Wilkins Co, 1996, p. 330-96.

EMANEINI, M. *et al.* Detection of vanB genotype enterococci in Iran. **International journal of antimicrobial agents**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 98, 2005.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature**: Genus *Enterococcus*. 2015. Disponível em: <http://www.bacterio.net/enterococcus.html>. Acesso em: 15 out. 2019.

EVERS, S.; COURVALIN, P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS (B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 178, n. 5, p. 1302-1309, 1996.

FABRETTI, F. *et al.* Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. **Infect Immun**, [s.l.], v. 74, n. 7, p. 4164-4171, 2006.

FACKLAM, R.R.; TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. *American Society of Microbiology*, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 1-54, 2002.

FALLAH, F. *et al.* Phenotypic and genotypic study of biofilm formation in *Enterococci* isolated from urinary tract infections. **Microbial pathogenesis**, [s.l.], v. 108, n. 1, p. 85-90, 2017.

FALKENBERG, M. B. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

FARON, M. L., LEDEBOER, N. A., BUCHAN, B. W. Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant enterococcus in the health care setting. **Journal of clinical microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 10, p. 2436-2447, 2016.

FERREIRA, D. T. *et al.* Antimicrobial activity and chemical investigation of Brazilian *Drosera*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 753-755, 2004.

FERREIRA, S. B. *et al.* β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Rev. Virtual Quim**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 140-160, 2010.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, [s.l.], v. 155, n. 6, p. 1749-1757, 2009.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Micro**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 623-633, 2010.

FOULQUIÉ-MORENO, M. *et al.* The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

FREIRE-MORAN, L. *et al.* Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria - Time to react is now. **Drug Resist Updat**, [s.l.], v.14, n. 1, p. 118-24, 2011.

FRYDMAN, B. *et al.* Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by β -lapachone and related naphthoquinones. **Cancer Research**, [s.l.], v. 57, n. 4, p. 620-627, 1997.

FURTADO, G. H. *et al.* Risk factors for vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* bacteremia in hospitalized patients: an analysis of two case-control studies. **Am J Infect Control**, v. 34, n. 7, p. 447-451, 2006.

GAO, W.; HOWDEN, B. P.; STINEAR, T. P. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. **Curr. Opin. Microbiol**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 76-82, 2018.

GIBBS, R. D. **Chemotaxonomy of Flowering Plants**. Montreal: University Press, 1974.

GRACY, R. W. *et al.* Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult?. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 428, n. 1, p. 17-22, 1999.

GUEX, C. G. *et al.* Avaliação da Atividade Antimicrobiana em Novos Compostos Heterocíclicos. **Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, [s.l.], v. 4, n.2, 2012.

GUIMARÃES, D. O. *et al.* Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUITON, P. S. *et al.* Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. **Infection and immunity**, v. 77, n. 9, p. 3626-3638, 2009.

HALL, M. J. *et al.* The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. **J Antimicrob Chemother**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 427-433, 1983.

HALLIWELL, B. A. R. R. Y.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **The Journal of laboratory and clinical medicine**, [s.l.], v. 119, n. 6, p. 598-620, 1993.

- HAN, S. H. *et al.* Lipoteichoic acid-induced nitric oxide production depends on the activation of platelet-activating factor receptor and Jak2. **J Immunol**, [s.l.], v. 176, n. 1, p. 573-579, 2006.
- HANCOCK, L. E.; PEREGO, M. The *Enterococcus faecalis* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. **Journal of bacteriology**, [s.l.], v. 186, n. 17, p. 5629-5639, 2004.
- HASHEM, Y. A. *et al.* Biofilm formation in enterococci: genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. **Scientificreports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 5733, 2017.
- HEALTH PROTECTION AGENCY. ***Enterococcus spp. and Glycopeptide Resistant Enterococci (GRE)***. 2005. Disponível em: <https://www.gov.uk/guidance/enterococcus-species-and-glycopeptide-resistant-enterococci-gre>. Acesso em: 22 fev. 2019.
- HEGSTAD, K. *et al.* Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Clinical microbiology and infection**, [s.l.], v. 16, n. 6, p. 541-54, 2010.
- HENDRICKX, A. P. *et al.* LPxTG surface proteins of *enterococci*. **Trends in microbiology**, [s.l.], v. 17, n. 9, p. 423-430, 2009.
- HENSLEY, K. *et al.* Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 28, n. 10, p. 1456-1462, 2000.
- HILL, E. E. *et al.* Infective endocarditis: changing epidemiology and predictors of 6-month mortality: a prospective cohort study. **EurHeart J**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 196-203, 2007.
- HILLARD, E. A. *et al.* Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 2612-2628, 2008.
- HOOPER, D. C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Emerging infectious diseases**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 337-340, 2001.
- HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, [s.l.], v. 3, n. 5, p. 421-569, 2012.
- HUBBLE, T. S. *et al.* Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiology and Immunology**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 121-126, 2003.
- HYNES, W. L. *et al.* The extracellular hyaluronidase gene (*hyla*) of *Streptococcus pyogenes*. **FEMS Microbiol. Lett.** [s.l.], v. 184, n. 1, p. 109-112, 2000.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. **Annu Rev Microbiol**, [s.l.], v. 57, n. 1, p. 395-418, 2003.

IZUMI, É. *et al.* Hemagglutinating and hemolytic activities of *Enterococcus faecalis* strains isolated from different human clinical sources. **Research in microbiology**, v. 156, n. 4, p. 583-587, 2005.

JACKSON, C. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and Euphorbia hirta leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **Journal of Medicinal Plants Research**, [s.l.], v. 3, n. 9, p. 666-669, 2009.

JAHANSEPAS, A. *et al.* Molecular Epidemiology of Vancomycin–Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Clinical Specimens in the Northwest of Iran. **Microbial Drug Resistance**. [s.l.], v. 24, n. 8, não p., 2018. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/mdr.2017.0380>. Acesso em: 16 fev. 2019.

JAMET, E. *et al.* Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. **Food microbiology**, [s.l.], v. 31, n. 2, p. 191-198, 2012.

JOHANSSON, D.; RASMUSSEN, M. Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora. **Microbial pathogenesis**, [s.l.], v. 55, n. 1, p. 28-31, 2013.

KAINER, M. A. *et al.* Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. **Emerging infectious diseases**, [s.l.], v. 13, n. 7, p. 1024-1030, 2007.

KAK, V.; CHOW, J. W. Acquired antibiotic resistances in enterococci. The enterococci. **American Society of Microbiology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 355-383, 2002.

KAYAOGLU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, [s.l.], v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **Int J Food Microbiol**, [s.l.], v. 88, n. 1, p. 123-131, 2003.

KOBAYAKAWA, S. *et al.* Biofilme formation of *Enterococcus faecalis* on intraocular lens material. **Current eye research**, [s.l.], v. 30, n. 9, p. 741-745, 2005.

KOBAYASHI, K. *et al.* Effects of quinone derivatives, such as 1,4-naphthoquinone, on DNA polymerase inhibition and anti-inflammatory action. **Med. Chem**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 37-44, 2011.

KOCH, S. *et al.* Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, [s.l.], v. 22, n. 7, p. 822-830, 2004.

KONEMANN, S. D. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

KOUIDHI, B. *et al.* Antibiotic resistance and adhesion properties of oral Enterococci associated to dental caries. **BMC microbiology**, [s.l.], v. 11, n. 1, não p., 2011.

KROGSTAD, D. J.; MOELLERING, R. C. **Antibiotics in laboratory medicine**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986.

KUMAGAI, Y. *et al.* The chemical biology of naphtho-quinones and its environmental implications. **Rev. Pharmacol. Toxicol.** [s.l.], v. 52, n. 1, p. 221-247, 2012.

LANCEFIELD, R. C. Serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **J. Exptl. Med**, [s.l.], v. 57, n. 1, p. 571-595, 1933.

LAPORT, M. S. *et al.* Expression of the major heat shock proteins DnaK and GroEL in *Streptococcus pyogenes*: a comparison to *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. **Curr Microbiol**, [s.l.], v. 42, n. 4, p. 264-268, 2000.

LEAVIS, H. L. *et al.* Insertion sequence–driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. **PLoS pathogens**, [s.l.], v. 3, n. 1, não p., 2007.

LEBER, A. L. **Synergism testing**: broth microdilution checker- board and broth macrodilution method. 4. ed. Washington, DC: ASM Press, 2016.

LEBRETON, F. *et al.* Which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by *Ers* and is involved in virulence. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 77, n. 7, p. 2832-2839, 2009.

LEE, J. K. *et al.* Chlorhexidine gluconate attenuates the ability of lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* to stimulate toll-like receptor 2. **J Endod**, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 212-215, 2009.

LEE, Y. Biofilm formation and antimicrobial resistance in *Enterococcus*. **Infection & chemotherapy**, [s.l.], v. 49, n. 3, p. 236-237, 2017.

LENZ, C. A.; FERSTL, C. M. H.; VOGEL, R. F. Sub-lethal stress effects on virulence gene expression in *Enterococcus faecalis*. **Food microbiology**, [s.l.], v. 27, n. 3, p. 317-326, 2010.

LI, R. C. New pharmacodynamic parameters for antimicrobial agents. **International journal of antimicrobial agents**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 229-235, 2000.

LIMA, O. G. Atividade antimicrobiana e antineoplásica de juglona, lapachol e plumbagina. **Rev Ints Antibiot**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 3-12, 1972.

LINARD, M. C. F. *et al.* Lapachol derivative active against mouse lymphocytic leukemia. **J. Med. Chem**, [s.l.], v. 18, n. 11, p. 1159-1161, 1975.

LINDEN, P. K. Optimizing therapy for vancomycin-resistant enterococci (VRE). **Semin Respir Crit Care Med**, [s.l.], v. 28, n. 6, p. 632-645, 2007.

LINDENSTRAUSS, A. G. *et al.* Identification of fitness determinants in *Enterococcus faecalis* by differential proteomics. **Archives of microbiology**, [s.l.], v. 195, n. 2, p. 121-30, 2013.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **Journal Of Hospital Infection**, [s.l.], v. 64, n. 4, p. 313-325, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2006.06.028>. Acesso em: 10 fev. 2019.

LOPES, M. D. F. S. *et al.* Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. **International journal of food microbiology**, [s.l.], v. 112, n. 3, p. 208-214, 2006.

LÓPEZ L. *et al.* Naphthoquinones: more than natural pigments. *Rev. Mex. Cienc. farm*, Ciudad de México, v. 42, n. 1, p. 6-17, 2011.

LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**: Laboratory methods used to assess the activity of antimicrobial combinations. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991.

LOURENÇO, A. L. *et al.* Identification of Nor- β -Lapachone Derivatives as Potential Antibacterial Compounds against *Enterococcus faecalis* Clinical Strain. **Curr Microbiol**, v. 62, n. 1, p. 684-689, 2011.

MACEDO, L. *et al.* β -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 25-29, 2013.

MACHADO, H. K. *et al.* Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s.l.], v. 39, n. 2, não p., 2011.

MATA-SANTOS, T. *et al.* Anthelmintic Activity Of Lapachol, B-Lapachone And Its Derivatives Against *Toxocara Canis* Larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 3, p. 197-204, 2015.

MATSUMURA, T. *et al.* Enterococcal bacteraemia: predictive and prognostic risk factors for ampicillin resistance. **Epidemiology & Infection**, [s.l.], v. 146, n. 16, p. 2028-2035, 2018.

MCKALLIP, R. J. *et al.* Plumbagin-induced apoptosis in lymphocytes is mediated through increased reactive oxygen species production, upregulation of Fas, and activation of the caspase cascade. **Toxicology and applied pharmacology**, [s.l.], v. 247, n. 1, p. 41-52, 2010.

MEDELL, M; *In vitro* antimicrobial susceptibility in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from hospitalized patients. **Biomedica**, v. 34, n. 1, p. 50-57, 2014.

MEKA, V. G. *et al.* Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. **The Journal of infectious diseases**, [s.l.], v. 190, n. 2, p. 311-317, 2004.

MENEZES, B. K. *et al.* Time-kill curves of daptomycin and Monte Carlo simulation for the treatment of bacteraemia caused by *Enterococcus faecium*. **Braz J Microbiol**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 169-176, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00200-4>. Acesso em: 16 abr, 2019.

MINGEOT-LECLERCQ, M. P. *et al.* Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, [s.l.], v. 43, n. 1, p. 737-737, 1999.

MIRO, J. M.; PERICAS, J. M.; RIO, A. A New Era for Treating *Enterococcus faecalis* Endocarditis. **Circulation**, [s.l.], v. 127, n. 17, p. 1763-1766, 2013.

MITCHELL, R. F. *et al.* Fuscumol and fuscumol acetate are general attractants for many species of cerambycid beetles in the subfamily Lamiinae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [s.l.], v. 141, n. 1, p. 71-77, 2012.

MOELLERING, R. C. *et al.* Studies on antibiotic synergism against enterococci: I. Bacteriologic studies. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, [s.l.], v. 77, n. 5, p. 821-828, 1971.

MOELLERING JUNIOR, R. C.; WENNERSTEN, C.; WEINBERG, A. N. Synergy of penicillin and gentamicin against enterococci. **Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 124, n. 1, p. 207-213, 1971.

MOHAMED, J. *et al.* Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**, [s.l.], v. 56, n. 12, p. 1581-1588, 2004.

MONIRI, R. *et al.* Virulence Gene's Relationship With Biofilm Formation and Detection of *aac* (6')/*aph* (2'') in *Enterococcus faecalis* Isolated From Patients With Urinary Tract Infection. **Jundishapur Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 6, não p., 2013.

MORAES, J. O. *et al.* Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. **International journal of food microbiology**, [s.l.], v. 281, n. 1, p. 90-100, 2018.

MOREL, F. *et al.* Effects of various inducers on the expression of cytochromes P-450 IIC8, 9, 10 and IIIA in cultured adult human hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, [s.l.], v. 4, n. 4-5, p. 458-460, 1990.

MORFIN-OTERO, R. *et al.* Enterococci as Increasing Bacteria in Hospitals: Why Are Infection Control Measures Challenging for This Bacteria? **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 129-142, 2018.

- MOURA, K. C. *et al.* 1,3-Azoles from ortho-naphthoquinones: synthesis of aryl substituted imidazoles and oxazoles and their potent activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 6482-6488, 2012.
- MUNDY, L. M. *et al.* Relation- ships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. **ClinMicrobiol Rev**, [s.l.], v. 13, n. 4, p. 513-522, 2000.
- MURRAY, B. E. The life and times of the Enterococcus. **Clinical microbiology reviews**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 46-65, 1990.
- NALLAPAREDDY, S. R. *et al.* A functional collagen adhesin gene, *acm*, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. **Infection and immunity**, [s.l.], v. 76, n. 9, p. 4110-4119, 2008.
- NALLAPAREDDY, S. R.; MURRAY, B. E. Ligand-signaled upregulation of *Enterococcus faecalis* ace transcription, a mechanism for modulating host-E.*faecalis* interaction. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 74, n. 9, p. 4982-4989, 2006.
- NAGANO, R. *et al.* Carbapenem derivatives as potential inhibitors of various β -lactamases, including class B metallo- β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s.l.], v. 43, n. 10, p. 2497-2503, 1999.
- NAGATA, K. *et al.* Antimicrobial activity of novel furanonaphthoquinone analogs. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 42, n. 1, p. 700-702, 1998.
- NIEBEL, M. *et al.* Deletions in a ribosomal protein-coding gene are associated with tigecycline resistance in *Enterococcus faecium*. **International journal of antimicrobial agents**, [s.l.], v. 46, n. 5, p. 572-575, 2015.
- O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chemico-biological interactions**, [s.l.], v. 80, n. 1, p. 1-41, 1991.
- O'DRISCOLL, T.; CRANK, C. W. Vancomycin-resistant enterococcal infections: Epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. **Infect. Drug Resist**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 217-230, 2017.
- OGIER, J. C. *et al.* Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 126, n. 1, p. 291-300, 2008.
- ONODERA, Y. *et al.* Inhibitory activities of quinolones against DNA gyrase and topoisomerase IV of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s.l.], v. 46, n. 6, p. 1800-1804, 2002.
- PACE, J. L.; YANG, G. Glycopeptides: update on an old successful antibiotic class. **Biochemical pharmacology**, [s.l.], v. 71, n. 7, p. 968-980, 2006.

PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. **International journal of food microbiology**, [s.l.], v. 140, n. 2-3, p. 164-168, 2010.

PANESSO, D. *et al.* Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: A prospective, multicenter study in South American hospitals. **J. Clin. Microbiol**, [s.l.], v. 48, n. 1, p. 1562-1569, 2010.

PAPILLON, S. C. *et al.* Comparison and validation of genomic predictors for anticancer drug sensitivity. **Journal of the American Medical Informatics Association**, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 597-602, 2013.

PARADELLA, T. C. *et al.* *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Rev Odontol Unesp**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 163-168, 2007.

PEPPOLONI, S. *et al.* Role of the (Mn) superoxide dismutase of *Enterococcus faecalis* in the in vitro interaction with microglia. **Microbiology**, v. 157, n. 6, p. 1816-1822, 2011.

PEREIRA, E. M. *et al.* Tabebuiaavellaneda naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and in vivo dermal irritability analysis. **Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 5, 2006.

PEROZO MENA, A. J. *et al.* Resistencia a Vancomicina en Cepas de *Enterococcus faecium* Aisladas nun Hospital Universitario. **RevistaKasmera**, [s.l.], v. 39, n. 1, não p. 2011.

PETERSEN, P. J. *et al.* In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 57, n. 3, p. 573-576, 2006.

PILLAI, S. K. *et al.* Antimicrobial combinations. In: LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 5. ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2005, p. 365-440.

POETA, P. *et al.* Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in *faecal enterococci* of wild animals in Portugal. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, [s.l.], v. 52, n. 9, p. 396-402, 2005.

PRETTO, J. B. *et al.* Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae / Guttiferae). **Zeitschrift fuer Naturforschung C**, [s.l.], v. 59, n. 9-10, p. 657-662, 2004.

RAMOS-PÉREZ C. *et al.* Yeast cytotoxic sensitivity to the antitumour agent beta-lapachone depends mainly on oxidative stress and is largely independent of microtubule- or topoisomerase-mediated DNA damage. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 92, n. 1, p. 206-219, 2014.

RAND, K. H. *et al.* Reproducibility of the micro- dilution checkerboard method for antibiotic synergy. **Antimicrob Agents Chemother**, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 613-615, 1993.

RATHNAYAKE, I. *et al.* Diversity of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a South East Queensland waterway, Australia, and associated antibiotic resistance gene profiles. **BMC microbiology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 201-218, 2011.

RIBOLDI, G. P. *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp isolated from food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p. 125-128, 2009.

RICE, L. B.; ELIOPOULOS, G. M. *In vitro* synergism between daptomycin and fosfomycin against *Enterococcus faecalis* isolates with high-level gentamicin resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 470-473, 1989.

RICH, R. L. *et al.* Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 38, p. 26939-26945, 1999.

RIOS, R.; *et al.* Genomic epidemiology of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) in Latin America: Revisiting the global VRE population structure. **BioRx**, [s.l.], v. 14, n. 1, não p., 2013.

ROCA, I. *et al.* The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New microbes and new infections**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 22-29, 2015.

RUDY, M. *et al.* Occurrence of antibiotic resistant enterococci in clinical specimens from a pediatric hospital. **Polish journal of microbiology**, [s.l.], v. 54, n. 1, p. 77-80, 2005.

RYAN, R. W.; KWASNIK, I.; TILTON, R. C. Methodological variation in antibiotic synergy tests against enterococci. **Journal of clinical microbiology**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 73-75, 1981.

SACRAMENTO, A. G. *et al.* Changed epidemiology during intra and interhospital spread of high-risk clones of vanA-containing *Enterococcus* in Brazilian hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, [s.l.], v. 88, n. 1, p. 348-351, 2017.

SADER, H. S. *et al.* Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011–2014). **Int J Antimicrob Agents**. [s.l.], v. 48, n. 1, p. 144-150, 2016.

SAFFARI, F. *et al.* Survey for correlation between biofilm formation and virulence determinants in a collection of pathogenic and fecal *Enterococcus faecalis* isolates. **Infection & chemotherapy**, [s.l.], v. 49, n. 3, p. 176-183, 2017.

SALAS, C. *et al.* Trypanosoma cruzi: Activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & medicinal chemistry**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 668-674, 2008.

SALMON-CHEMIN, L. *et al.* 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothionereductase and lipoamidedehydrogenasa from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and *in vitro* cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 44, n. 1, p. 548-565, 2001.

SANDERS, C. C. Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 1-8, 2001.

SANDOE, J. *et al.* Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. **Journal of medical microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 7, p. 547-550, 2003.

SANTHANA, R. L. Mesosomes are definite event in antibiotic-treated *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **TropBiomed**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 105-107, 2007.

SCHITO, G. C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical microbiology and infection**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 3-8, 2006.

SCHIWON, K. *et al.* Comparison of Antibiotic Resistance, Biofilm Formation and Conjugative Transfer of *Staphylococcus* and *Enterococcus* Isolates from International Space Station and Antarctic Research Station Concordia. **Microbial Ecology**, [s.l.], v. 65, n. 3, p. 638-651, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-013-0193-4>. Acesso em: 26 mar. 2019.

SEDGLEY, C. M. *et al.* Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. **Oral microbiology and immunology**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 95-101, 2004.

SHERMAN, J. M. The streptococci. **Bact. Revs**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 3-97, 1937.

SELVARAJ, C. *et al.* Structural elucidation of SrtA enzyme in *Enterococcus faecalis*: an emphasis on screening of potential inhibitors against the biofilm formation. **Molecular BioSystems**, [s.l.], v. 10, n. 7, p. 1775-1789, 2014.

SEMEDO, T. *et al.* Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? **Systematic and Applied Microbiology**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 13-22, 2003.

SHANKAR, N. *et al.* Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. **Infect Immun**, [s.l.], v. 67, n. 1, p. 193-200, 1999.

SHANKAR, N. *et al.* *Enterococcal cytolysin*: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. **International Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], n. 293, n. 7-8, p. 609-618, 2004.

SHANKAR, N. *et al.* Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. **Infect Immun**, [s.l.], v. 69, n. 1, p. 4366-4372, 2001.

SHRIDHAR, S; DHANASHREE, B. Antibiotic Susceptibility Pattern and Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Enterococcus* spp. **Interdisciplinary Perspectives On Infectious Diseases**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.1-6, 2019.

SIEVERT, D. M. *et al.* National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Families: Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infect Control Hosp Epidemiol**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 1-14, 2013.

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

SILVA, J. L. *et al.* In vitro synergic effect of beta-lapachone and isoniazid on the growth of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 104, n. 4, p. 580-582, 2009.

SINGH, K. V. *et al.* Importance of the collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. **PLoS Pathogens**, [s.l.], v. 6, n. 1, não p., 2010.

SIQUEIRA JUNIOR, F.; ROCAS, I. N. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. **Braz Dent J**, [s.l.], v. 18, n. 4, p. 267-280, 2007.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F. *et al.* Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. **Journal of Endodontics**, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 332-335, 1999.

SOBISCH, L. Y. *et al.* Biofilm Forming Antibiotic Resistant Gram-Positive Pathogens Isolated From Surfaces on the International Space Station. **Front Microbiol**, [s.l.], v. 10, n. 1, não p., 2019. Disponível em: 10.3389/fmicb.2019.00543. Acesso em: 10 mar. 2019.

SOLTANI, S. *et al.* Prevalence of virulence genes and their association with biofilm formation in VRE faecium isolates from Ahvaz, Iran. **The Journal of Infection in Developing Countries**, [s.l.], v. 12, n. 11, p. 970-977, 2018.

SOUZA, E. S. Mortality and risks related to healthcare-associated infection. **Texto & Contexto-Enfermagem**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 220-228, 2015.

SPERA, R. V.; FARBER, B. F. Multiply-resistant *Enterococcus faecium*: the nosocomial pathogen of the 1990s. **Jama**, [s.l.], v. 268, n. 18, p. 2563-2564, 1992.

STIEFEL, U. *et al.* 2014. Gastrointestinal colonization with a cephalosporinase-producing *Bacteroides* species pre- serves colonization resistance against vancomycin-resistant *Enterococcus* and *Clostridium difficile* in cephalosporin-treated mice. **Antimicrob Agents Chemother**, [s.l.], v. 58, n. 1, p. 4535-4542, 2014.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, [s.l.], v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

STRATEVA, T. *et al.* Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 127-133, 2016.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

TALLARIDA, R. J. Quantitative methods for assessing drug synergism. **Genes & cancer**, [s.l.], v. 2, n. 11, p. 1003-1008, 2011.

TENDOLKAR, P. M. *et al.* Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infection and immunity**, [s.l.], v. 72, n. 10, p. 6032-6039, 2005.

TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2002. p. 422-33.

THALLINGER, B. *et al.* Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 97-109, 2013. Disponível em: doi. 10.1002/biot.201200313. Acesso em: 18 abr. 2019.

THIERCELIN, M. E. Sur undiplocoquesaphrophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. **Compt. rend. soc.biol**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 269-271, 1899.

THOMAS, V. C. *et al.* Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. **J. Bacteriol.** [s.l.], v. 190, n. 1, p. 5690-5698, 2008.

THURLOW, L. R. *et al.* Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. **Infection and immunity**, [s.l.], v. 78, n. 11, p. 4936-43, 2010.

TIAN, Y. *et al.* Effect of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on apoptosis in human osteoblast-like cells. **Journal of endodontics**, [s.l.], v. 39, n. 5, p. 632-637, 2013.
TOLEDO-ARANA, A. *et al.* The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol**, [s.l.], v. 67, n. 10, p. 4538-4545, 2001.

TRAN, T. *et al.* Quinones as antimycobacterial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 4809-4813, 2004.

TREMBLAY, C. L.; ARCHAMBAULT, M. Interference in Pheromone-Responsive Conjugation of a High-Level Bacitracin Resistant *Enterococcus faecalis* Plasmid of Poultry Origin. **International journal of environmental research and public health**, [s.l.], v. 10, n. 9, p. 4245-60, 2013.

TYNE, D. *et al.* Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. **Toxins**, [s.l.], v. 5, n. 5, p. 895-911, 2013.

TOYE, B. *et al.* Clinical and epidemiological significance of *enterococci* intrinsically resistant to vancomycin (possessing the vanC genotype). **J Clin Microbiol**, [s.l.], v. 35, n. 12, p. 3166-3170, 1997.

ULRICH-MERZENICH, G. S. Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products-Potential and challenges for drug development. **Synergy**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 59-69, 2014.

UPADHYAYA, P. G.; RAVIKUMAR, K. L.; UMAPATHY, B. L. Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen. **Indian journal of medical microbiology**, v. 27, n. 4, p. 301, 2009.

URBINA-DAZA, A. *et al.* Estudio teórico de compuestos derivados de cefalosporinas con potencial actividad inhibitoria frente a proteína de unión a penicilina (PBP) y resistencia a enzimas betalactamasa de espectro extendido (BLEE) producidas por *Escherichia coli*. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, Bogotá, v. 48, n. 1, p. 44-60, 2019.

VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. **Clinical microbiology reviews**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 430-450, 2003.

VAN, T.; GILMORE, M. S. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. **Annual review of microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 1, p. 337-356, 2014.

VAN AMERSFOORT, E. S. *et al.* Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. **Clin Microbiol Rev**, [s.l.], v. 16, n. 16, p. 379-414, 2003.

VAN ACKER, H.; VAN DIJCK, P.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends in microbiology**, [s.l.], v. 22, n. 6, p. 326-333, 2014.

VAN DER VIJVER, L. M. **Naphtoquinones of Plumbaginaceae and Ebenaceae**. Amsterdam: Vrijen Universiteit Amsterdam, 1975.

VAN HARTEN, R. M. *et al.* Multidrug-resistant enterococcal infections: new compounds, novel antimicrobial therapies? **Trends Microbiol**. [s.l.], v. 25, n. 1, p. 467-479, 2017 Disponível em: 10.1016/j.tim.2017.01.004. Acesso em: 19 jun. 2019.

VEGA, S.; DOWZICKY, M. J. Antimicrobial susceptibility among Gram-positive and Gram-negative organisms collected from the Latin American region between 2004 and 2015 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. **Clinical microbiology and antimicrobials**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 50, 2017.

VERNEUIL, N. *et al.* Implication of (Mn) superoxide dismutase of *Enterococcus faecalis* in oxidative stress responses and survival inside macrophages. **Microbiology**, [s.l.], v. 152, n. 9, p. 2579-2589, 2006.

VIGNAROLI, C. *et al.* Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. **Current microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 5, p. 1438-1447, 2011.

VON NUSSBAUM, F. *et al.* Antibacterial natural products in medicinal chemistry—exodus or revival?. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 45, n. 31, p. 5072-5129, 2006.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 97-110, 2009.

WANG, J. S. *et al.* Central nervous system infections due to vancomycin-resistant enterococci: case series and review of the literature. **Int J Infect Dis**, [s.l.], v. 25, n. 1, p. 26-31, 2014.

WALSH, C. Antibiotics: actions, origins, resistance. **American Society for Microbiology (ASM)**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 335, 2003.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, City of Microbes. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 182, n. 10, p. 2675-2679, 2000.

WEINER, L. M. *et al.* Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. **Infect. Control Hosp. Epidemiol**, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 1288–1301, 2016.

WERNER, G. *et al.* Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Eurosurveillance**, [s.l.], v. 13, n. 47, p. 1-11, 2008.

WINK, M. *et al.* Secondary metabolites from plants inhibiting ABC transporters and reversing resistance of cancer cells and microbes to cytotoxic and antimicrobial agents. **Frontiers in microbiology**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 130, 2012.

WITTEBOLLE, V. *et al.* Antifungal effects of aminosulphoxide and disulphide derivatives. **Mycoses**, [s.l.], v. 49, n. 3, p. 169-175, 2006.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **The Journal of infection**, [s.l.], v. 59, n. 1, p. 4-16, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report 2016–2017**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report-2016-2017/en/>. Disponível em: 18 mar. 2019.

WORTH, L. J. *et al.* Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanB: clonal distribution, prevalence and significance of esp and hyl in Australian patients with haematological disorders. **Journal of Hospital Infection**, [s.l.], v. 68, n. 2, p. 137-144, 2008.

ZAPUN, C. A. *et al.* Vernet, Penicillin-bindingproteins and b-lactam resistance. **FEMS Microbiol. Rev.**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 361-385, 2008.