



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

LUCIANNA DE CÁSSIA RAMOS ALVES

Atividade da beta-lapachona em associações com antimicrobianos sobre cepas *Klebsiella pneumoniae* multidroga resistentes utilizando o método *overlay inoculum susceptibility disc*

Recife

2022

LUCIANNA DE CÁSSIA RAMOS ALVES

Atividade da beta-lapachona em associações com antimicrobianos sobre cepas *Klebsiella pneumoniae* multidroga resistentes utilizando o método *overlay inoculum susceptibility disc*

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, como requisito parcial à obtenção do título em Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof.^a Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Recife

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

ALVES , Lucianna de Cássia Ramos .

Atividade da beta-lapachona em associações com antimicrobianos sobre cepas *Klebsiella pneumoniae* multidroga resistentes utilizando o método overlay inoculum susceptibility disc / Lucianna de Cássia Ramos ALVES . - Recife, 2022.

47 : il., tab.

Orientador(a): Eulália Camelo Pessoa de Azevedo XIMENES
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2022.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. β -lapachona. 3. Sinergismo. 4. Zona de inibição ($\pm$ SEM) . 5. Carbapenemase. I. XIMENES, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo . (Orientação). II. Título.

570 CDD (22.ed.)

LUCIANNA DE CÁSSIA RAMOS ALVES

Atividade da beta-lapachona em associações com antimicrobianos sobre cepas *Klebsiella pneumoniae* multidroga resistentes utilizando o método *overlay inoculum susceptibility disc*

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, como um dos requisitos exigidos para obtenção do título em Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Prof.^o Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

Aprovada em: 07/ 10/ 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Raissa Ximenes Lima MSD
Universidade Federal de Pernambuco

Renan Andrade Fernandes de Souza MSD
Universidade Federal de Pernambuco

*Em memória de meus amados avós Neci Maria dos Santos Ramos e Genival
Rodrigues da Silva (in memoriam), sinônimo de amor,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar e me apoiar por todo o meu caminho e durante toda a minha trajetória, estando comigo principalmente nos momentos de dificuldades.

Aos meus pais e irmão, por todo apoio, incentivo e dedicação em me ajudar durante todos esses anos. E a minha madrinha por todas as orações e apoio e ajuda que me deu.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes, pela oportunidade de fazer parte de seu laboratório, por toda paciência, incentivo, confiança e conhecimento compartilhado.

Aos meus companheiros de laboratório por todo o apoio e conhecimentos compartilhado.

As minhas amigas de turma, todo o apoio, carinho e incentivo que trocamos durante esses anos de curso.

Obrigada!

RESUMO

Os isolamentos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC) aumentaram na última década, principalmente nos ambientes hospitalares. Além de causarem infecções graves essas bactérias são resistentes a várias classes de antibióticos, as quais incluem os β -lactâmicos e carbapenêmicos. Pacientes com infecções por cepas KPC tem as taxas de mortalidade elevadas e a terapia é limitada a administração de aminoglicosídeos, tigeciclina e polimixinas. Diante desse relato, as pesquisas para aplicar novas terapias e obter novos fármacos são necessárias. Os compostos de origem natural representam uma fonte importante na obtenção de moléculas bioativas, importantes por se apresentarem farmacologicamente ativas. Desta forma, objetivo deste estudo foi avaliar pelo método de macrodiluição em caldo, a atividade antimicrobiana da beta-lapachona frente a dez cepas de *K. pneumoniae* (KPC) e o estudo das associações com antimicrobianos (tigeciclina- TGC, cefepime- CPM, meropenem- MER, amoxicilina + ácido clavulânico- AMC e cefotaxima- CTX) pelo método *Overlay inoculum susceptibility disc*. Todas as cepas de *K. pneumoniae* mostraram um perfil de resistência a todos os antimicrobianos avaliados, cujos valores percentuais do aumento do diâmetro da zona de inibição ($\pm$ SEM) em mm, variaram de 22,95 a 57,42 mm. A cepa LFBM-KPC (11) mostrou ser a mais sensível à beta-lapachona em associação as antimicrobianos convencionais. Um efeito sinérgico da beta-lapachona com os antimicrobianos foi observado principalmente para a associação com o meropenem. A beta-lapachona foi capaz de inibir o crescimento das cepas de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase e pode servir de protótipo para futuros compostos com atividade antimicrobiana.

Palavras chaves: *Klebsiella pneumoniae*, β -lapachona, Sinergismo, Zona de inibição ($\pm$ SEM), Carbapenemase.

ABSTRACT

Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) isolates have increased in the last decade, especially in hospital environments. In addition to causing serious infections these bacteria are resistant to various classes of antibiotics, which include β -lactams and carbapenems. Patients with KPC strain infections have high mortality rates and therapy is limited to the administration of aminoglycosides, tigecycline and polymyxins. In view of this report, research to apply new therapies and obtain new drugs is necessary. Compounds of natural origin represent an important source in obtaining bioactive molecules, which are important because they are pharmacologically active. In this way, the objective of this study was to evaluate by the broth macrodilution method the antimicrobial activity of beta-lapachone against ten in front of *K. pneumoniae* (KPC) and the study of associations with antimicrobials (tigecycline- TGC, cefepime-CPM, meropenem- MER, amoxicillin + clavulanic acid- AMC and cefotaxime- CTX) by the Method Overlay inoculum susceptibility disc. All *k. pneumoniae* strains showed a resistance profile to all evaluated antimicrobials, whose percentage values of the increase in the diameter of the inhibition zone ($\pm$ ESM) in mm ranged from 22,95 to 57.42 mm. The LFBM-KPC strain (11) proved to be the most sensitive to beta-lapachone in association with conventional antimicrobials. A synergistic effect of beta-lapachone with antimicrobials has been observed primarily for the association with meropenem. Beta-lapachone was able to inhibit the growth of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* strains and may serve as a prototype for future compounds with antimicrobial activity.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, β -lapachone, Synergism, inhibition zone ($\pm$ ESM), Carbapenemase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Isolamento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em meio Verde Brillante Vermelho de Fenol ágar (BPLS).....	13
Figura 2- Esquema mostrando diferentes fatores de virulência e patogenicidade em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
Figura 3- Representação do LPS	16
Figura 4- Representação das colônias de <i>K. pneumoniae</i>	17
Figura 5- Representação da estrutura química da estreptomicina	21
Figura 6- Representação da estrutura química da polimixina B e E	22
Figura 7- Representação da estrutura química dos Beta lactâmicos	24
Figura 8- Representação da estrutura química minociclina e tigeciclina	25
Figura 9- Classificação quinonas.....	26
Figura 10 - Estrutura química da Beta- lapachona	27
Figura 11- Reativação das culturas estoque de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
Figura 12- Cultivo de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em ágar verde brilhante, vermelho de fenol- lactose e sacarose – BPLS Ágar	30
Figura 13- Esquema das etapas que compõem a coloração de Gram	31
Figura 14- Kit de identificação bioquímica para Enterobactérias- Laborclin	31
Figura 15- Sistema de filtração (F) a vácuo utilizando membrana milipore de 0,22 µm de porosidade(G).....	32
Figura 16- Representação ilustrativa do método <i>overlay inoculum susceptibility disc</i>	34
Figura 17- Microscopia ótica de um esfregaço da cultura de <i>Klebsiella pneumoniae</i> após coloração de Gram. Aumento 1000x	35
Figura 18- Exemplo do resultado da identificação bioquímica das cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	36
Figura 19- Resultado da caracterização bioquímica para <i>K. pneumoniae</i>	36
Figura 20- Aumento percentual da zona de inibição da associação beta-lapachona com discos de antimicrobianos.....	41
Figura 21- Aumento percentual da zona de inibição da associação beta-lapachona com discos de antimicrobianos.....	41
Figura 22- Gráficos do aumento percentual da zona de inibição da associação beta-lapachona com discos de antimicrobianos convencionais	42
Figura 23- Comparação entre controle e teste da cepa LFBM-KPC ()para o teste de sinergismo entre beta-lapachona e convencionais.....	43
Figura 24- Comparação entre controle e teste para o teste de sinergismo entre beta-lapachona e convencionais.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CPM	Cefepime
CTX	Cefotaxima
hvKP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulenta
OMP	Proteínas de membrana externa
ESBL	β -lactamases de espectro estendido
LPS	Lipopolissacarídeos
CPS	Capsula polissacarídica
AMC	Amoxiciclina + ácido clavulânico
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
MER	Meropenem
TGC	Tigeciclina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	<i>A Klebsiella pneumoniae</i>	12
2.2	FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE EM <i>k. pneumoniae</i> PRODUTORA DE CARBAPENEMASES- KPC	14
2.2.1	Lipopolissacarídeos- LPS	15
2.2.2	Sideróforos	16
2.2.3	Cápsula Polissacarídica	17
2.2.4	Fímbrias	18
2.3	ELEMENTOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM <i>k. pneumoniae</i>	18
2.3.1	Carbapenemase do tipo KPC	19
2.4	TRATAMENTO	19
2.4.1	Aminoglicosídeos	20
2.4.2	Polimixinas	21
2.4.3	β-lactâmicos	23
2.4.4	Glicilciclinas	24
2.5	QUINONAS	25
2.5.1	Naftoquinonas	26
2.5.2	β-lapachona	27
3	OBJETIVO	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	MICROORGANISMOS E PREPARAÇÃO DO INÓCULO	29
4.2	CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>k. pneumoniae</i>	29
4.2.1	Coloração de Gram	30
4.2.2	Identificação das cepas de Klebsiella pneumoniae através de reações bioquímicas	31
4.2.3	β- lapachona e antimicrobianos convencionais	32
4.3	ASSOCIAÇÃO DA BETA-LAPACHONA EM CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS (½ X CIM) AOS ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAIS	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

5.1	COLORAÇÃO DE GRAM	35
5.2	ANÁLISE BIOQUÍMICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>k. pneumoniae</i>	35
5.3	SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	37
5.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE A BETA- LAPACHONA E ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAIS	38
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

A *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase é um importante patógeno oportunista que acomete principalmente pacientes imunossuprimidos e ou com comorbidades associadas e tem alta correlação com as infecções nosocomiais em ambientes hospitalares, sendo um dos maiores causadores de mortalidade e morbidade. Este microrganismo está associado a diversas infecções, incluindo pneumonias, infecções do trato genito urinário, abscessos hepáticos e septicemias. (DE SOUSA *et al.*, 2020; Wang, *et al.*, 2020).

Os carbapenêmicos é a classe de antimicrobianos de escolha no tratamento de infecções por enterobactérias. Em decorrência da utilização indiscriminada desse tipo de medicação, as bactérias vêm apresentando mecanismos de resistência a diversas classes de antimicrobianos. Perante o exposto, a produção de carbapenemases por bacilos Gram-negativos é o mecanismo de resistência que vem sendo regularmente associado a *K. pneumoniae*. Esta enzima, no entanto, não confere resistência apenas aos carbapenêmicos, como também atribui a esses microrganismos a capacidade de hidrolisar cefalosporinas e monobactâmicos (LIMA, 2018).

Devido a resistência expressa por este patógeno, associada a presença de carbanemases, as opções de tratamento de tratamento tornam-se cada vez mais limitadas, tendo em vista o seu caráter resistente a maioria dos antimicrobianos de escolha para seu tratamento. A alternativa encontrada tem sido a associação entre classes já existentes de antimicrobianos. Atualmente mesmo diante dessa estratégia, já existem algumas cepas de *K. pneumoniae* que se mostram resistentes a essas associações (LAN, Peng *et al.*, 2021).

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade da β -lapachona em associação com antimicrobianos (Amoxicilina + ácido clavulânico; cefepime; cefotaxima; meropenem; tigeciclina) frente a cepas de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo Gram negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, KONEMAN *et al*, (2018), traz a divisão desta família em tribos, sendo elas: Tribo *Escherichieae*, Tribo *Edwardsiellae*, Tribo *Klebsiellae*, Tribo *Proteeae* e Tribo *Yersinieae*. A tribo *Klebsiellae* por sua vez é dividida em quatro gêneros principais: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* e *Serratia*, todos estes apresentam espécies de microrganismos considerados patógenos oportunistas de importância médica devido as suas particularidades e persistências. Sendo o gênero *Klebsiella* o de interesse nesse trabalho, as espécies deste gênero são amplamente distribuídas pela natureza e na microbiota intestinal de humanos e animais, além de serem bastante relatados como causas frequente de infecções nosocomiais.

Este patógeno é facilmente disseminado em ambiente hospitalar e em unidades de prestação de cuidados de saúde, o que lhes atribui o título de patógeno oportunista nosocomial, principalmente infecções do trato urinário, respiratório e associados a circulação sanguínea. Em geral, acomete principalmente pacientes imunossuprimidos e ou com comorbidades associadas, seja depois da colonização por cepas do ambiente hospitalar ou depois de procedimentos invasivos, como punções, cirurgias entre outros. No entanto, já existem relatos de cepas de *K. pneumoniae* hipervirulenta capazes de infectar indivíduos imunocompetentes. (PITOUT *et al.*, 2015; KONEMAN *et al.*, 2018; MARTIN *et al*, 2018).

Morfologicamente, membros da família *Enterobacteriaceae* tendem a formar grandes colônias de coloração cinza-opaca, podendo apresentar aspecto seco ou mucóide, em isolamento em meio sólido (Figura 1). As colônias mucóides, por sua vez, sugerem cepas encapsuladas de *K. pneumoniae*. A identificação clássica desse grupo de patógenos é feita com base em características fenotípicas que são expressas por estes microrganismos como, ser um bacilo Gram negativo, sem presença de flagelos, encapsuladas, capazes de fermentar a glicose e serem não produtoras de citocromo oxidase, além disto, a identificação deste

patógeno pode ser confirmada através de testes bioquímicos como: testes para identifica a capacidade de fermentar glicose, de descarboxilar aminoácidos (lisina, ornitina e arginina), produção de indol, motilidade, a utilização de citrato como fonte de carbono, a capacidade de hidrolisar ureia, entre outros testes que provem a presença ou ausência de enzimas características da espécie. (KONEMAN *et al*, 2018; KANO, 2020).

Figura 1- Isolamento de *Klebsiella pneumoniae* em meio Verde Brilhante Vermelho de Fenol ágar (BPLS)



Fonte: A autora.

De acordo com AFONSO *et al.* (2022), as *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC-KP) tem sido atribuída como um dos patógenos oportunistas mais associados às infecções nosocomiais. Dentre os grupos de risco predisponentes a aquisição da bacteremia nosocomial causada por *K. pneumoniae* encontram-se: pacientes diabéticos, transplantados, função hepática reduzida e pacientes que fazem diálise (TAVARES, 2019).

Sendo assim, apesar da existência de microrganismos desta mesma espécie que se são classificados como não produtores de carbapenemases, estes ainda sim são patógenos de importância médica. No entanto, diante da existência dessa enzima que atribui características de resistência aos antimicrobianos e a falta de novos fármacos que se mostrem eficientes

frente aos microrganismos produtores de carbapenemases, foi de interesse usar esta última bactéria citada como objeto de interesse nesse estudo.

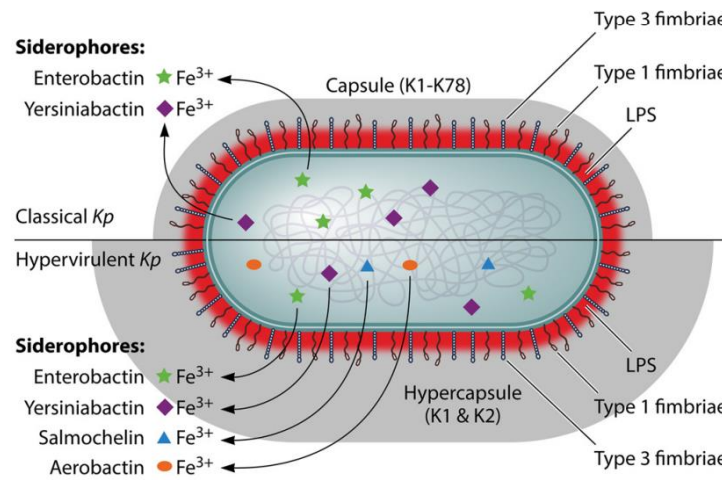
O crescente aumento das infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* são motivos de constante preocupação global, e tornam-se ainda mais relevantes devido a existência de cepas resistentes à agentes antimicrobianos (CHUNG *et al*, 2016). Segundo dados levantados por LAN, Peng *et al* (2021), a resistência aos antimicrobianos de escolha ao tratamento de *K. pneumoniae* tem aumentado cada vez mais com o passar dos anos. O resultado dessa resistência se deve ao uso indiscriminado de antibióticos e a falta de novos antimicrobianos dentro da terapêutica destas infecções (MARTIN *et al*, 2018).

Levando em consideração a constante inovação tecnológica existente, a influência e a representatividade da indústria farmacêutica, tornando-a um elemento substancial na sociedade, além da previa experiência das pessoas com diagnósticos médicos e ações profiláticas, contribuem com esse uso exacerbado de medicamentos. Este por sua vez, pode ser atribuído aos fenômeno da medicalização e farmacêuticalização (DE FIGUEREDO *et al.*, 2020).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE EM *k. pneumoniae* PRODUTORA DE CARBAPENEMASES- KPC

A patogenicidade da *Klebsiella* spp. está associada a diversos fatores de virulência (Figura 2). Dentre eles, a presença da capsula polissacarídica e a sua capacidade de aumentar a secreção desta os tornando capazes da produção de biofilmes responsáveis por contaminar principalmente materiais de uso médico como as pontas de cateteres e sondas, por serem microrganismos muito ativos e possuem uma grande capacidade de fermentação da lactose e sacarose, à presença de adesinas presentes ou não nas suas fímbrias as quais auxiliam na sua fixação as mucosas do corpo humano, são exemplos de alguns dos seus fatores de virulência os quais contribuem para a sua patogenicidade (PEREIRA, 2020; ROCHA, 2021).

Figura 2- Esquema mostrando diferentes fatores de virulência e patogenicidade em *Klebsiella pneumoniae*



Fonte: PACZOSA, MECSAS, (2016).

O poder de adaptação atribuí a *K. pneumoniae* a habilidade necessária para transpor a detecção pelo sistema imunológico do hospedeiro, bem como contra as possíveis alterações hostis do meio envolvente. Tais competências contribuem assim para o sucesso da invasão, sobrevivência e crescimento no hospedeiro (ROCHA, 2021).

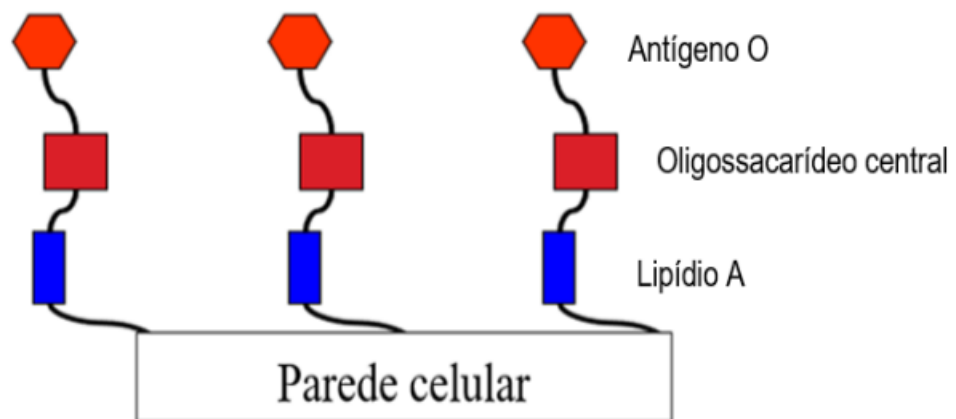
Tendo em vista os múltiplos mecanismos existentes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae*, onde estes incluem desde produção de carbapenemases, expressão diminuta ou perda de proteínas de membrana externa (OMPs) com superexpressão de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e cefalosporinases AmpC, e o acionamento de bombas de efluxo. Além destes, tem-se quatro classes de fatores de virulência caracterizados para *K. pneumoniae*, sendo estes: lipopolissacarídeos, sideróforos, cápsulas polissacarídicas, e fímbrias (LAN, Peng *et al.*, 2021; PACZOSA *et al.*, 2017).

2.2.1 Lipopolissacarídeos- LPS

O lipopolissacarídeo é um componente significativo presente na organização externa da membrana extracelular dos microrganismos Gram negativos, possui uma importante função na defesa de *Klebsiella pneumoniae* contra o sistema de defesa humoral do hospedeiro, em contrapartida também atua como um forte modulador da imunidade do hospedeiro o que explica o poder desse microrganismo em acerbicar a dimensão da resposta

imune deste. A membrana externa deste microrganismo segue uma estrutura organizacional sendo formada pelo antígeno O, pela cadeia polissacarídica central e pelo lipídio A (Figura 3). A aptidão dessa estrutura como fator de virulência, provém da capacidade de plasticidade do LPS e da atividade da toxina pelo lipídio A e pela capacidade protetora do lipídio O (DA SILVA, 2020; ROCHA, 2021).

Figura 3- Representação do LPS



Fonte: TAVARES, (2019).

2.2.2 Sideróforos

O sistema de captação de ferro para a *Klebsiella pneumoniae* é um importante fator de virulência que garante a sobrevivência perante o organismo do hospedeiro (PEREIRA, 2020). Por sua vez, estes microrganismos produzem os sideróforos, compostos orgânicos responsáveis pela captação de ferro. Secretadas como agente quelante essa molécula garante ao microrganismo a capacidade de captação de ferro em ambientes com baixas concentrações deste. Além disto, atualmente com o aparecimento de variações de *K. pneumoniae* hipervirulenta (hvKP), a produção em grande quantidade desta molécula tem sido utilizada como um importante biomarcador para a identificação destas cepas (DA SILVA, 2020; LAN, Peng *et al.*, 2021).

Segundo DA SILVA (2020), em *Enterobacteriaceae*, em conjunto com a enterobactina, dois sistemas de sideróforos são mais prevalentes: a aerobactina e a

yersiniabactina. Sendo o último citado encontrado em menor fração nas enterobactérias em relação a aerobactina.

2.2.3 Cápsulas Polissacarídicas

A cápsula bacteriana consiste em uma substância polissacarídica produzida no citoplasma bacteriano e secretado para a superfície onde está fisicamente ligado à célula bacteriana.

Um dos caracteres fenotípicos que permitem a identificação de *K. pneumoniae* é a formação de colônias grandes e de aspecto mucóide (Figura 4), essa característica é atribuída pela presença da cápsula polissacarídica bacteriana (CPS). A presença desta estrutura é determinante para a virulência em *K. pneumoniae* uma vez que, uma das suas funções mais importantes é evitar que o microrganismo seja fagocitado pelas células de defesa do hospedeiro através da adesão das bactérias em diferentes tipos de substratos, essa facilidade de adesão contribui também para a formação de uma matriz extra celular que podem estar envolvidos na formação de biofilmes, estes que tendem a se aderir em materiais de uso médico como, ponta de cateteres venosos, sondas, próteses, entre outros materiais. O que dificulta e compromete a eficácia do tratamento (KONEMAN *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2020; ROCHA, 2021).

Figura 4- Representação das colônias de *K. pneumoniae*



Fonte: A autora

2.2.4 Fímbrias

As fímbrias são elementos que contribuem para a adesão aos tecidos, órgãos, a outras bactérias e a superfícies, estas estão ancoradas na membrana externa das células bacterianas. Em *Klebsiella pneumoniae*, as fímbrias mais estudadas incluem as dos tipos 1 (manose-sensível) e 3 (manose-resistente), sendo a última, importante na produção de biofilme (PACZOSA *et al*, 2016; DA SILVA, 2020).

As fímbrias do tipo 1 possuem hemaglutininas sensíveis a manose que se estendem até a cápsula, por este motivo medeiam a adesão bacteriana às estruturas que possuem manose na célula hospedeira ou na matriz extracelular através da adesina fimH (Figura 4). As fímbrias do tipo 3 são resistentes a manose e caracterizadas por ser adesiva é codificada pelo gene mrkD. Essa fimbria possui a capacidade de ligar-se ao colágeno presente na matriz celular hospedeira, o que explica a sua atuação na produção de biofilme (LI *et al*, 2014; DA SILVA, 2020; ROCHA, 2021).

2.3 ELEMENTOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *k. pneumoniae*

As enzimas β lactamases de espectro estendido (ESBL) são encontradas em diversas espécies de bactérias, por sua vez, viabilizam a resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (PEREIRA, 2020). Diante disto, as enterobactérias possuem um mecanismo de resistência que é a produção de β lactamases do tipo carbapenemase as quais têm a capacidade de hidrolisar o anel β lactâmico por meio da hidroxilação irreversível do grupo amida, desta forma o antimicrobiano perde o seu poder de inibir a síntese da parede celular microbiana (ABRANTES *et al*, 2017).

Existem duas classificações para as carbapenemases, a classificação de Ambler (1980), que se baseia na sequência de aminoácidos, reunindo-os de acordo com a estrutura da β lactamase; e a classificação de Bush fundamentada na reação entre o tipo de substrato e as propriedades inibitórias dessas enzimas (ABRANTES *et al*, 2017). Segundo VERA-LEIVA *et al.*, (2017), pela classificação de Bush as carbapenemases são encontradas nos grupos 2df, 2f

e 3, porém segundo a classificação de Ambler (1980), as mesmas enzimas estão localizadas nos grupos A, B e D.

2.3.1 Carbapenemase do tipo KPC

O termo “KPC” é associado a uma enzima, que foi identificada em todos os membros clinicamente importantes da família *Enterobacteriaceae*, porém, ocorre com mais frequência em *Klebsiella pneumoniae*, o primeiro relato desta enzima no Brasil foi em São Paulo no ano de 2009, após um estudo de vigilância sanitária com amostras isoladas no período de 2003 a 2008. O mecanismo de resistência aos carbapenêmicos mais relevante deve-se à ação das enzimas carbapenemases do tipo KPC, por serem capazes de hidrolisar todas as classes de cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos, limitando as opções terapêuticas eficazes. Diante disso, existência de cepas bacterianas produtoras de carbapenemases ocasiona hoje no Brasil e no mundo um problema grave de saúde pública. (DA SILVA *et al.*, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2009; AFONSO *et al.*, 2022; ROCHA 2021).

Devido a sua importância na saúde pública, a identificação de cepas microbianas produtoras de carbapenemase tem sido cada vez mais requisitadas, e com isso, a adoção de metodologias como: disco difusão e concentração inibitória mínima (CIM) de carbapenêmicos pode ser uma alternativa como forma de triagem para detecção dessas enzimas.

As enzimas do tipo KPC da classe A de Ambler são capazes de hidrolisar antibióticos como, penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Entretanto, podem ter sua ação inibida pela utilização do ácido clavulânico, tazobactam e o ácido borônico. Além disto, são codificadas por plasmídeos, e são suscetíveis a ação de apenas alguns antimicrobianos como as polimixinas, aminoglicosídeos e colistina (DU *et al.*, 2014; ESCANDÓN-VARGAS *et al.*, 2016; BATISTA, 2020).

2.4 TRATAMENTO

Segundo AFONSO *et al.*, 2022, o tratamento dos processos infecciosos decorrentes de KPC-KP é dependente da utilização dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos (TSA)

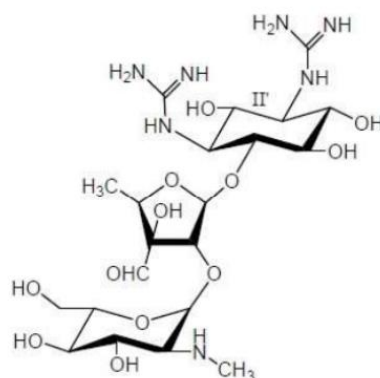
(apud LU et al., 2020) . Sendo assim, a determinação do perfil de sensibilidade é fundamental para a escolha terapêutica adequada a cada paciente (ANVISA, 2021).

Atualmente as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos causam infecções graves como infecções respiratórias e de corrente sanguínea. Segundo dados levantados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2021), infecções causadas por esses microrganismos vêm sendo associadas com altas taxas de mortalidade (de 40 a 50%), no Brasil, as taxas de resistência aos carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro (terceira e/ou quarta gerações) foram de, 44,3% para *Klebsiella pneumoniae* (ANVISA 2021). Mediante isso, o tratamento ideal das infecções decorrentes deste patógeno é incerto, dado a natureza investigativa e observacional da maioria dos estudos sobre este tópico, além das opções limitadas de antibióticos, demandando uma abordagem multifacetada (BASSETTI *et al.*, 2018; BASSETTI & PEGHIN, 2020).

2.4.1 Aminoglicosídeos

Na literatura, os aminoglicosídeos são reportados como a classe mais antiga de antimicrobianos caráter bactericida, esse seu perfil se deve a capacidade de ligação de forma irreversível às proteínas do sítio A da região 16S da subunidade 30S do ribossomo bacteriano causando falha na tradução do mRNA ou quebra das ligações dos polirribossomos resultando assim, em sequências de aminoácidos incorretos resultando em proteínas defeituosas ou o impedimento da síntese proteica. (KANO, 2020; ROCHA, 2021).

Dentro da classe dos aminoglicosídeos, a estreptomicina foi o primeiro fármaco descrito em 1944 por Waksman (Figura 5), sendo em sua maioria de origem natural. Após esse marco mais de 200 novos aminoglicosídeos foram descobertos, sendo produzidos por microrganismos típicos do solo como *Streptomyces spp.* e *Micromonospora spp.* De modo geral, possuem um amplo espectro de ação e apresentam atividade contra microrganismos Gram negativos como o *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, assim como Gram positivos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus spp.* (RIBEIRO, 2017).

Figura 5- Representação da estrutura química da estreptomicina**Estreptomicina**

Fonte: Adaptado de Magnet e Blanchard, (2005).

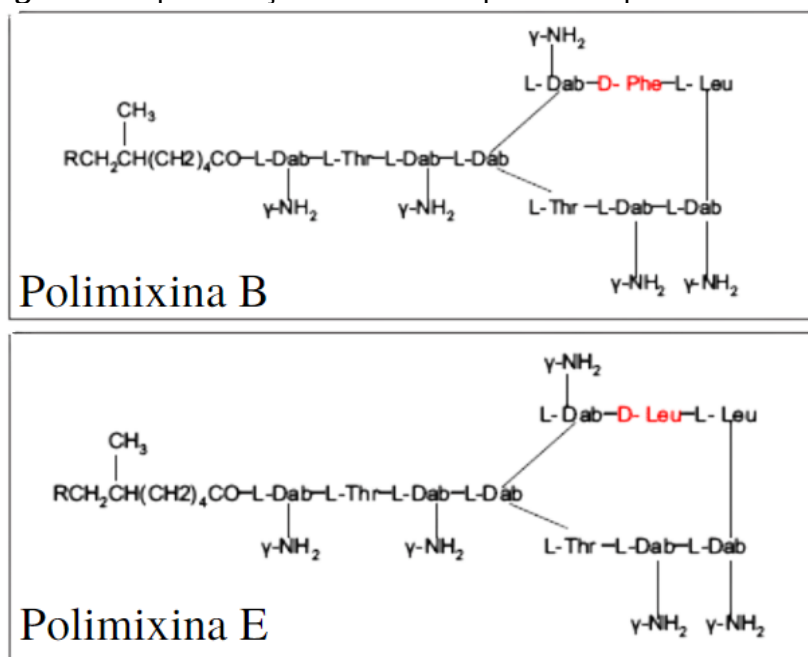
Devido aos padrões de resistência as quais as cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbanemases vem apresentando ultimamente, e dentre os aminoglicosídeos disponíveis, estas cepas vem mostrando uma pequena sensibilidade apenas aos antimicrobianos gentamicina e amikacina, ressaltando assim a necessidade da utilização de terapia combinada ao invés de monoterapia. No entanto, estudos vem apontando a substituição do uso dessa classe de antimicrobianos pelas cefalosporinas de 3º geração e carbanemicos. Ademais, vale ressaltar que alguns dos efeitos colaterais mais relevantes dessa classe de antimicrobianos é a nefrotoxicidade (a depender do caso pode ser reversível) e ototoxicidade permanente. (LIMA, 2018; ROCHA, 2021; AFONSO *et al*, 2022).

2.4.2 Polimixinas

Descobertas em 1947, as polimixinas foram isoladas do *Bacillus polymyxa*, posteriormente classificado como *Paenibacillus polymyxa* (1993). Juntas, as polimixinas constituem um grupo de cinco decapeptídeos policatiônicos cíclicos sendo eles as Polimixinas A, B, D e E. A polimixina B e E diferem entre si apenas a posição dos aminoácidos ligados a posição seis (Figura 6). Dentre estas cinco moléculas, apenas duas apresentam aplicações terapêuticas, sendo estas a Polimixina B e a Polimixina E, a primeira citada foi a primeira a ser isolada, a segunda, foi isolada em 1950 do *Bacillus colistinus*, as demais polimixinas não são utilizadas em clínica devido à alta toxicidade. Essa classe de antimicrobianos tem seu mecanismo de ação por ligação aos lipopolissacarídeos e as moléculas de fosfolipídios

dispostos sobre a membrana externa de bactérias Gram negativas, pela presença destas moléculas, a membrana se torna carregada positivamente o que explica a interação com as polimixinas (MENDES *et al*, 2009; COGO *et al*, 2014; TRIMBLE *et al*, 2016).

Figura 6- Representação da estrutura química da polimixina B e E



Fonte: Adaptado de ELIAS, (2010).

Com o surgimento constante de novas cepas bacterianas resistentes, foi necessário o retorno dos antibióticos polimixina, colistina (polimixina E) e polimixina B, onde estes, vem assumindo um papel importante como terapia de resgate para as infecções por KPC-KP. A polimixina B tem sido o agente de escolha para uso sistêmico de rotina em infecções invasivas, uma vez que possui características farmacocinéticas superiores em humanos, bem como um potencial diminuído para causar nefrotoxicidade. Posto isto, a polimixina E (colistina) vem sendo o fármaco de escolha para o tratamento de infecções do trato urinário inferior, dada a depuração renal do pró-fármaco. Tendo em vista o ressurgimento dessa classe de antimicrobianos no tratamento de infecções causadas por microrganismo multirresistente, tem-se posto em questão pelas diretrizes globais, o caráter nefrotóxico dessas moléculas em uso prolongado desses tratamentos (AFONSO *et al.*, 2022; BASSETTI & PEGHIN, 2020).

2.4.3 β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são agentes antibacterianos que podem ser de origem natural ou sintética, atuam inibindo de forma irreversível a síntese da enzima transpeptidase. Essa enzima nas bactérias, atuam catalisando a reação de transpeptidação entre cadeias de peptidioglicanos presentes na parede bacteriana, impedindo assim a rigidez que se forma devido a presença de ligações cruzadas entre as cadeias de peptídeos da estrutura de peptidioglicanos (GUIMARÃES, *et al* 2010).

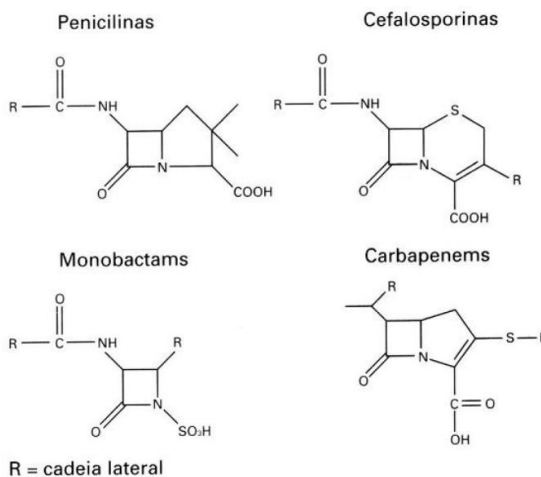
Os antibióticos β -lactâmicos são os fármacos de preferência nas prescrições médicas para o tratamento das infecções humanas além disso, essa classe de antimicrobiano possui amplo espectro de atividade com alta atividade bactericida, disponibilidade oral, ausência de toxicidade ao paciente entre outras propriedades. Contudo, com o surgimento de cepas bacterianas multirresistentes, a administração de β -lactâmicos em alguns casos, tem revelado um insucesso terapêutico (BARBOSA *et al*, 2020).

As apresentação de enzimas β -lactamases constituem o principal mecanismo de resistência a essa classe de antimicrobianos, estas enzimas por sua vez, apresentam grupamentos nucleofílicos que normalmente são resíduos de serina, capazes de promoverem a hidrólise do anel β -lactâmico, neste contexto a modificação molecular presente no componente farmacofórico da droga responsável pela resistência desenvolvida pelas bactérias produtoras de β -lactamases, foi a introdução de grupos de grande volume do carbono α ao carbono carbonílico da cadeia lateral em penicilinas semissintéticas, a adição desses grupos volumosos impedem o acesso dos antibióticos ao sítio ativo da enzima. O maior número de fármacos β -lactâmicos em administração clínica estão dentro da classe das cefalosporinas, estas são subdivididas em ordem crescente de acordo com o espectro de ação mais ampliado frente a microrganismos Gram negativos, cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações (GUIMARÃES, *et al* 2010; DE FREITAS SOUZA *et al.*, 2022).

O grupo dos antimicrobianos β lactâmicos são divididos em penicilinas, cefalosporinas, carbanemos e monobactâmicos (Figura 7). Atualmente os antibióticos de escolha ao tratamento de KPC-KP tem se resumido a classe das cefalosporinas (3° cefotaxima e 4° cefepime, gerações); carbapenemos (Meropenem, Imipinem, Ertapenem) e os monobactâmicos (Aztreonam). No entanto, a singular capacidade de mutação dessas cepas

resistentes tem dificultado a utilização da monoterapia mesmo com as classes mais novas de antimicrobianos resistentes as β lactamases (AFONSO *et al*, 2022).

Figura 7- Representação da estrutura química dos Beta lactâmicos

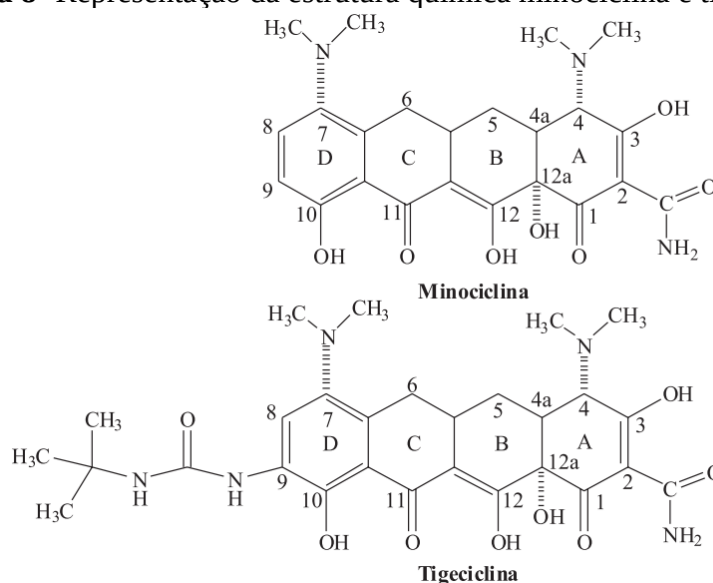


Fonte: WILLIAMS, (1999).

As cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC, por sua vez é um exemplo de microrganismo Gram negativo resistente a praticamente todas as opções viáveis de tratamento monoterapico com essas classes de antimicrobianos. Em frente a isto, tem surgido novas opções terapêuticas de tratamento associado, entre estes os mais utilizados para estas cepas de KPC-KP são as associações entre fármacos de classes diferentes, como: Ceftazidima-avibactam, Meropenem-vaborbactam (AFONSO *et al*, 2022; BASSETTI & PEGHIN, 2020; ROCHA, 2021).

2.4.4 Glicilciclinas

As glicilciclinas são um grupo de moléculas quimioterápicas sintetizadas pela primeira vez em 1993, são assim produtos semissintéticos semelhantes as tetraciclina. As glicilciclinas vem sendo utilizadas em tratamentos alternativos contra microrganismos resistentes as demais classes de antibióticos. No ano de 2005 a tigeciclina, uma glicilciclina derivada da minociclina (Figura 8), foi aprovada para uso clínico pelo Food and Drug Administration (FDA) (PEREIRA-MAIA, *et al* 2010).

Figura 8- Representação da estrutura química minociclina e tigeciclina

Fonte: Adaptado de PEREIRA-MAIA, *et al* (2010).

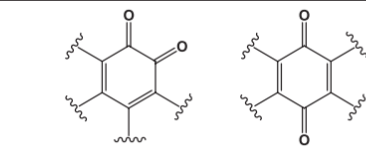
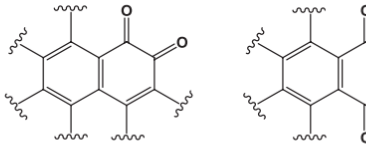
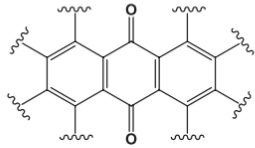
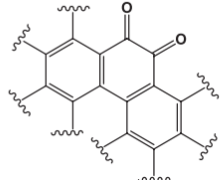
Esta classe de antimicrobianos atua ligando-se de forma reversível à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, dificultando a entrada do RNA transportador ao sítio A, impedindo o alongamento das cadeias peptídicas e interrompendo a síntese proteica (LIMA, 2018). Todavia, atualmente, a tigeciclina tem apresentado uma eficácia surpreendente em estudos com KPC-KP *in vitro* e *in vivo*, porém é preciso atentar-se às baixas concentrações séricas obtidas pelas dosagens usuais. Estudos atuais mostram que o uso deste antimicrobiano em terapias de associação tem mostrado um resultado muito mais promissor que o uso deste em monoterapia (BASSETTI & PEGHIN, 2020).

2.5 QUINONAS

As quinonas compõem um grupo de metabólitos secundários de ocorrência natural, pertencentes a classe Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Oxigenados (HPAO), além disto normalmente são coloridas e semivoláteis. Estas moléculas vêm se mostrando cada vez mais relevantes devido a sua importância farmacológica, esta se dá devido à organização de suas moléculas. A estrutura das quinonas apresentam dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, estes situam-se relativamente em posições "orto" (adjacentes) ou "para". Diante do exposto até aqui, estas moléculas são caracterizadas por

um tipo de sistema aromático que se formam decorrente das posições dos grupamentos carbonílicos, sendo assim, são classificadas em três subgrupos de acordo com os sistemas aromáticos que possuem; como: benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenantraquinonas (Figura 9) (FERREIRA *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2020).

Figura 9- Classificação quinonas

Grupo		Sistema aromático	Estruturas Básicas
1. Benzoquinonas	→	Anel benzênico	
2. Naftoquinonas	→	Anel naftalênico	
3. Antraquinonas	→	Anel antracênico	
4. Fenantraquinonas	→	Anel fenantrênico	

Fonte : SOUSA, Eliane Teixeira; LOPES, Wilson A.; ANDRADE, Jailson B. (2016).

2.5.1 Naftoquinonas

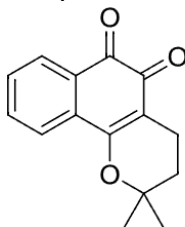
As naftoquinonas são fitoquímicos com grande atividade farmacológica (MACEDO, L. *et al.*, 2013). Com o conhecimento popular em muitas localidades plantas ricas naftoquinonas são utilizadas no tratamento de diversas enfermidades desde vários tipos câncer a doenças parasitárias. De acordo com SILVA, *et al* (2012) “Naftoquinonas são metabolitos secundários produzidos por algas fungos, plantas e animais” (*apud* Thomson, 1991). Dividem-se em 1,2- e 1,4-naftoquinonas e, em função da presença de anel heterocíclico oxigenado, assim ainda, podem ser classificadas como difuronaftoquinonas e piranonaftoquinonas, mostrando assim a grande variação estrutural do grupo. Além disso, as

moléculas de naftoquinonas presentes na família *Bignoniaceae* expressam várias atividades biológicas, sendo assim um dos grupos de origem natural mais estudados (SILVA, *et al* 2012).

2.5.2 β -lapachona

A β -lapachona (Figura 10) é um metabolito secundário naturalmente obtido a partir do Lapachol, este é conhecido desde 1858 e é facilmente extraído das cascas de plantas do gênero *Tabebuia* (Tecoma) que pertence à família *Bignoniaceae* (MACEDO, L. *et al.*, 2013). As quinonas, sejam elas naturais ou sintéticas são substâncias com grande poder em atividade biológica, sendo testadas e investigadas suas atividades antitumorais moluscicidas, leishmanicidas, anti-inflamatórias, antifúngicas, tripanocidas, antiprotozoárias e inibidoras da enzima transcriptase reversa do vírus HIV-1. Além destes existem estudos recentes que comprovam a atividade antimicrobiana destes ativos contra microrganismos multirresistentes como o *Staphylococcus aureus* MRSA (FERREIRA *et al*, 2010; MACEDO, L. *et al.*, 2013).

Figura 10 - Estrutura química da Beta- lapachona



Fonte: FERREIRA, Sabrina B. *et al.* (2010).

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar e avaliar o efeito sinérgico da β -lapachona e antimicrobianos convencionais sobre cepas *Klebsiella pneumoniae* multidroga resistentes.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

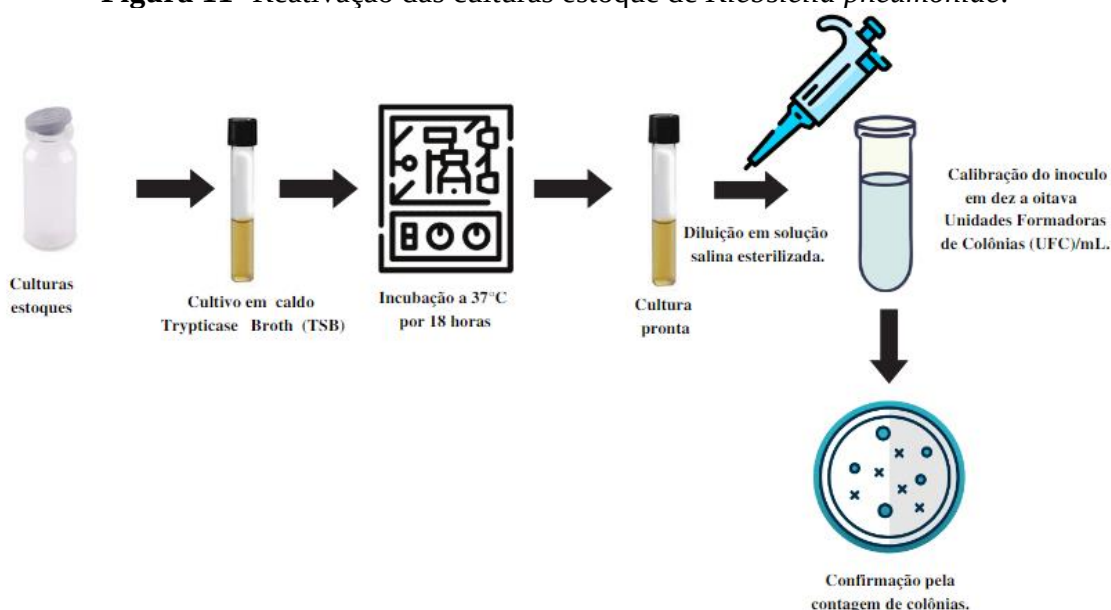
- Determinar a susceptibilidade de cepas de *Klebsiella pneumoniae* frente a cinco antimicrobianos (Amoxicilina + ácido clavulânico; cefepime; cefotaxima; meropenem; tigeciclina).
- Avaliar a efeito entre a β -lapachona e os antimicrobianos através da determinação do percentual de aumento dos halos de inibição.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

As cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (n= 10) foram obtidas de culturas-estoques mantidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos–Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. Como mostra a Figura 11, esses microrganismos foram cultivados em caldo Trypticase Broth (TSB) da MERCK, incubados à 37° C por 18 horas. As culturas foram diluídas em solução salina esterilizada para ao final obter um inóculo de 10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL, a escala de McFarland será utilizada para comparação visual da turvação da solução e posteriormente confirmado por enumeração das colônias.

Figura 11- Reativação das culturas estoque de *Klebsiella pneumoniae*.



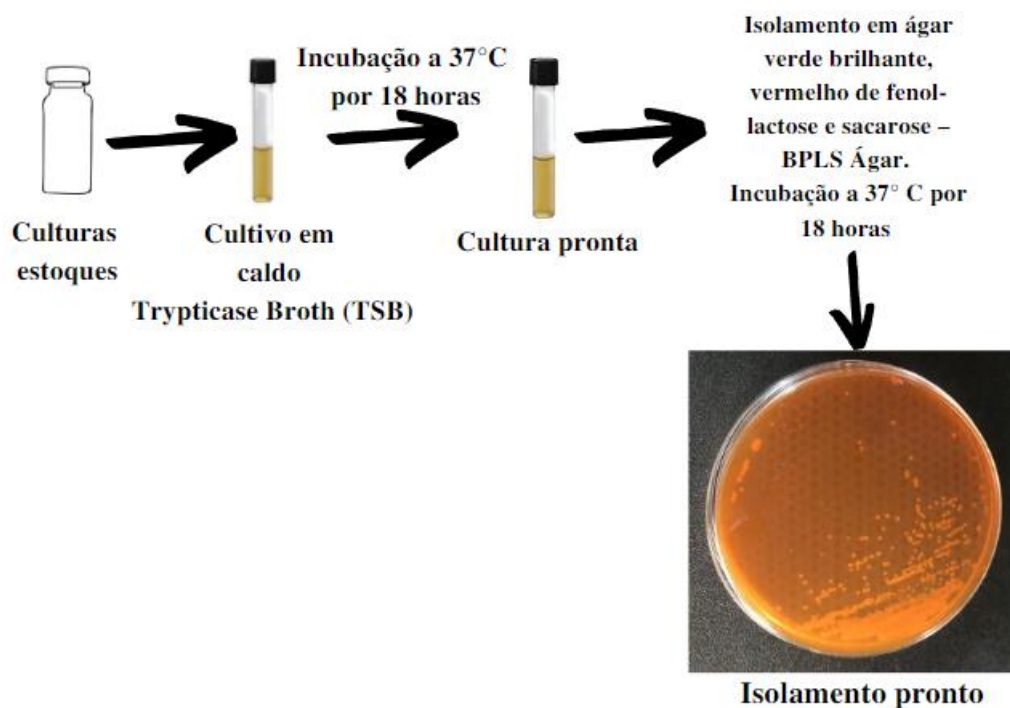
Fonte : A autora

4.2 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *K. pneumoniae*

A confirmação da identificação das cepas de *Klebsiella pneumoniae* foi realizada a partir de culturas em caldo Trypticase Broth (TSB) da MERCK obtidas a partir das culturas-estoques. Em seguida, essas culturas foram semeadas em ágar verde brilhante, vermelho de

fenol-lactose e sacarose ágar (Brilliant-green phenol-red lactose sucrose-BPLS ágar) da MERCK, (Figura 12). Com base no isolamento em meio seletivo para enterobactérias foi realizada a coloração de Gram para visualização de bacilos Gram negativos. Além dessa avaliação foram realizados testes bioquímicos de: Rugai sem sacarose, LMI, MIO, Ramnose e Meio de Citrato; para confirmar a identificação das cepas utilizadas nesse estudo.

Figura 12- Cultivo de *Klebsiella pneumoniae* em ágar verde brilhante, vermelho de fenol-lactose e sacarose – BPLS Ágar

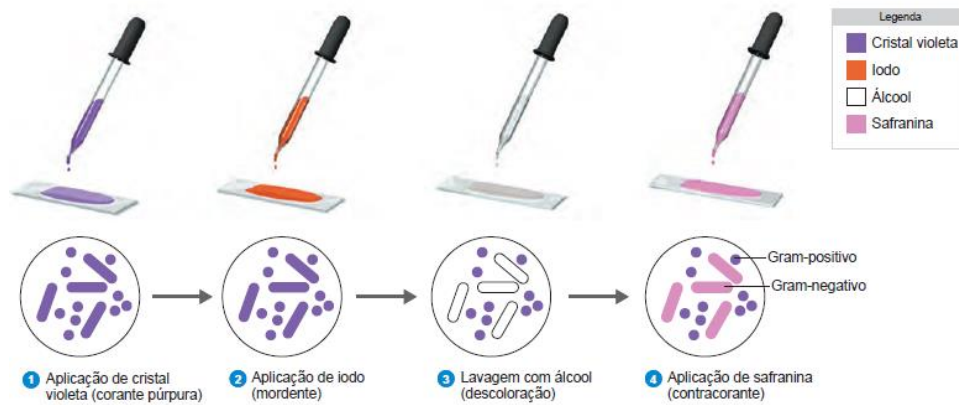


Fonte: A autora

4.2.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram (Figura 5), foi realizada com base na técnica descrita por Hans Christian Joachim Gram em 1884, esta foi realizada por meio de um esfregaço a partir das culturas previamente isoladas em meio seletivo, com o objetivo de visualizar bacilos Gram negativos.

Figura 13- Esquema das etapas que compõem a coloração de Gram

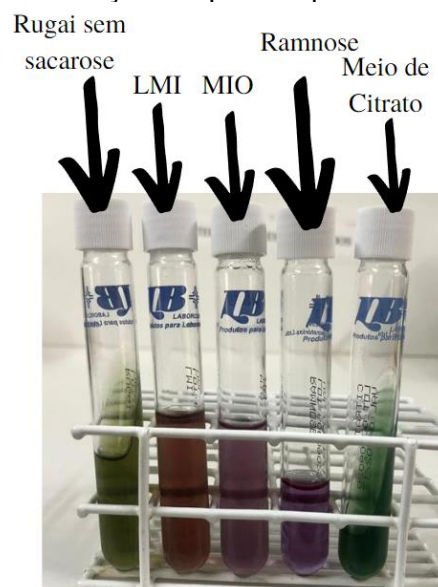


Fonte: Página da Kavi

4.2.2 Identificação das cepas de *Klebsiella pneumoniae* através de reações bioquímicas

A identificação das cepas de *K. pneumoniae* foi realizada utilizando o kit Laborclin (Figura 6), composto por 5 meios de cultura sendo eles: Rugai sem sacarose (tubo 1), LMI (tubo 2), MIO (tubo 3), Ramnose (tubo 4) e Meio de Citrato (tubo 5). Juntos, fornecem 10 provas bioquímicas capazes de identificar o microrganismo quanto a presença/ausência de enzimas vitais para a sobrevivência deste.

Figura 14- Kit de identificação bioquímica para Enterobactérias- Laborclin



Fonte: A autora.

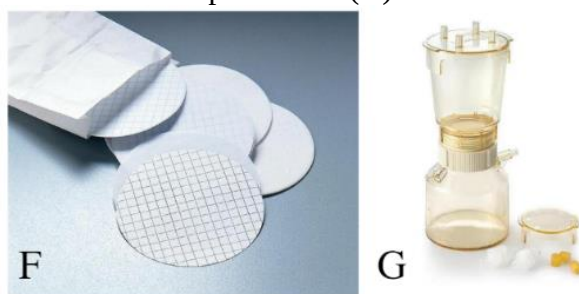
4.2.3 β - lapachona e antimicrobianos convencionais

A síntese da beta-lapachona foi realizada a partir do lapachol, o qual foi obtido por extração da serragem do Ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*) de acordo com a metodologia descrita por Lima et al. (1962).

A β - lapachona foi solubilizada em um sistema composto por etanol/ Tween 80/ água nas proporções de (1:0,5:8,5). A solução foi esterilizada por filtração a vácuo (Figura 15-F) utilizando membrana Milipore® de 0,22 μ m de porosidade e 150 μ m de espessura (Figura 15-G).

Discos padronizados contendo os antimicrobianos, marca Cecon, foram utilizados para este ensaio, a saber: tigeciclina – TGC (15 μ g), cefepime - CPM (30 μ g), meropenem – MER (10 μ g), amoxiciclina + ácido clavulânico - AMC (30 μ g), cefotaxima – CTX (30 μ g). Esses antimicrobianos foram escolhidos com base no levantamento realizado sobre os tratamentos que vem sendo utilizados com mais frequência e no percentual de resistência destes medicamentos.

Figura 15- Sistema de filtração (F) a vácuo utilizando membrana milipore de 0,22 μ m de porosidade(G)



Fonte: Página da MERK (F); Página da Loja NelLab (G)

A resistência foi definida para cada antimicrobiano de acordo com os critérios estabelecidos pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCAST (BrCAST, 2019) baseados nos pontos de corte da versão 9.0 de 2019 do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. Para amoxiciclina + ácido clavulânico (diâmetro de halo ≤ 19 mm) e cefepime (diâmetro de halo ≤ 24 mm), cefotaxima (diâmetro de halo ≤ 17 mm) tigeciclina (diâmetro de halo ≤ 18 mm), estabelecido pela NOTA TÉCNICA N° 01/2013 da ANVISA (Tabela 1).

Tabela 1- Padrões interpretativos de diâmetros de halos de inibição (milímetros) para os antibióticos frente a membros da família *Enterobacteriaceae* de acordo com o Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCAST (BrCAST, 2019); NOTA TÉCNICA N° 01/2013 (ANVISA).

Antimicrobianos	Sensível (mm)	Intermediário (mm)	Resistente (mm)
Amoxiciclina + Ácido Clavulânico	≥19	-	≤19
Cefepime	≥27	24- 26	≤24
Cefotaxima	≥20	17- 19	≤17
Meropenem	≥22	16- 21	≤16
Tigeciclina	≥18	-	≤18

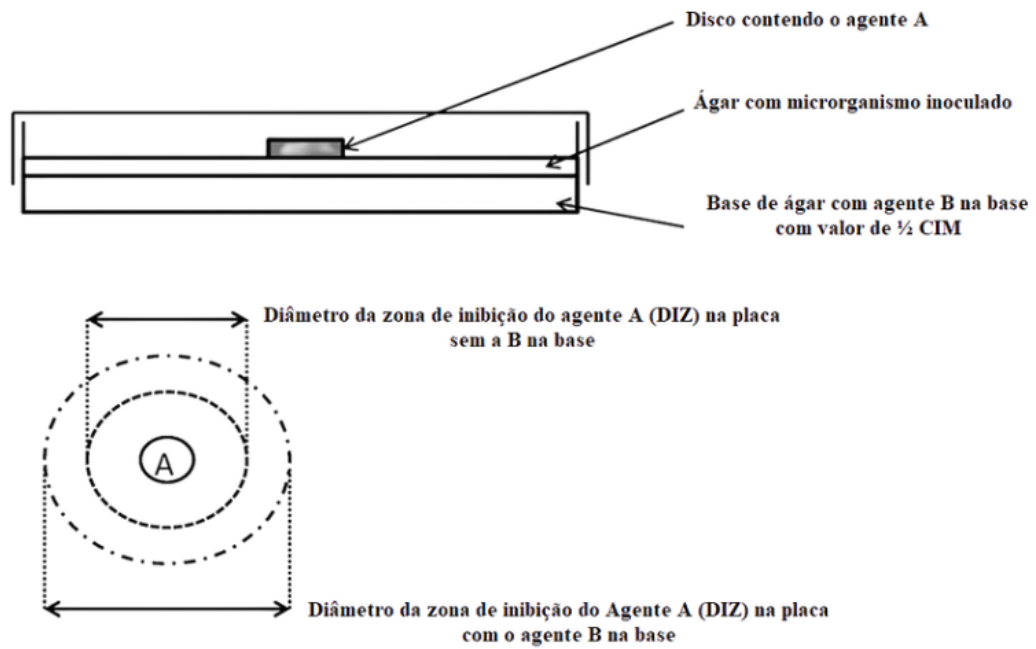
4.3 ASSOCIAÇÃO DA BETA-LAPACHONA EM CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS (½ X CIM) AOS ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAIS.

Para avaliação das associações de beta-lapachona e tigeciclina, cefepime, meropenem, amoxicilina + ácido clavulânico e cefotaxima foi utilizada o método *overlay inoculum susceptibility disc*, descrito por Laisharm et al. 2017, com algumas modificações.

O método *overlay inoculum susceptibility disc* é basicamente uma modificação do método de difusão em meio sólido. Uma solução de 2 mL (dois) de beta-lapachona em concentração equivalente a ½ da CIM foi incorporada a 8 mL ágar Trypticase soja e vertidos sobre as placas. A concentração inibitória mínima (CIM) utilizada foi descrita por LIMA, (2018).

Em seguida sobre esse meio foi vertido mais 9 mL do mesmo meio e as placas foram postas em superfície plana até total solidificação. Após esse procedimento, com a ajuda de um swab foi semeada cultura de *Klebsiella pneumoniae* previamente padronizada em 10^8 UFC/mL obtida por comparação a escala de McFarland. Em seguida os discos de tigeciclina, cefepime, meropenem, amoxicilina + ácido clavulânico e cefotaxima foram dispostos sobre à superfície do meio de forma equidistante (Figura 16). As placas foram incubadas à 37° por 18 horas. Um aumento no diâmetro da zona de inibição (DZI) em torno do disco de 19% corresponde a um efeito sinérgico, ≤19% correspondem ao efeito aditivo e nenhuma variação do DZI é indicativo de indiferença (LAISHRAM et al., 2017; NWORU et al, 2006).

Figura 16- Representação ilustrativa do método *overlay inoculum susceptibility disc*



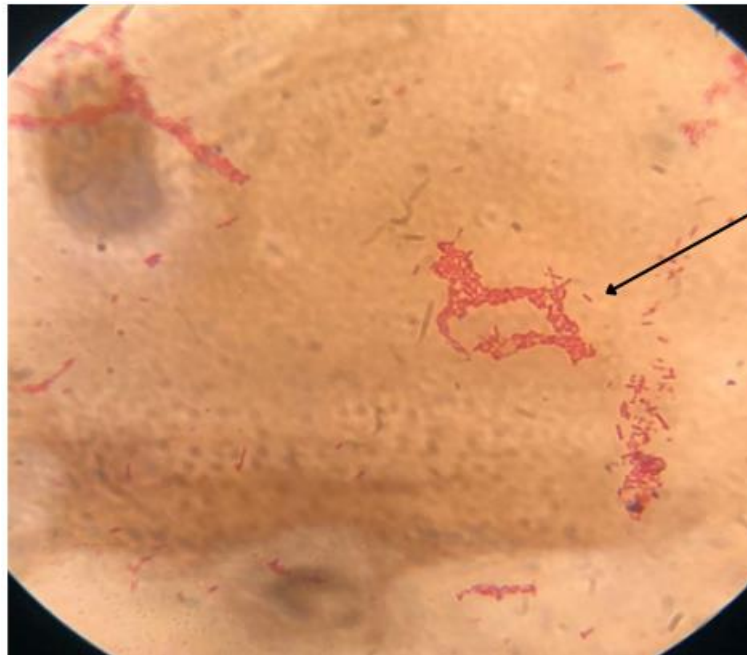
Fonte: Adaptado de LAISHRAM *et al.*, (2017)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COLORAÇÃO DE GRAM

A avaliação microscópica da cultura de *Klebsiella pneumoniae* revelou bacilos Gram negativos (Figura 17). Os resultados mostraram que os isolados obtidos das culturas de estoque se mantem puros diante a análise da morfologia e coloração.

Figura 17- Microscopia ótica de um esfregaço da cultura de *Klebsiella pneumoniae* após coloração de Gram. Aumento 1000x

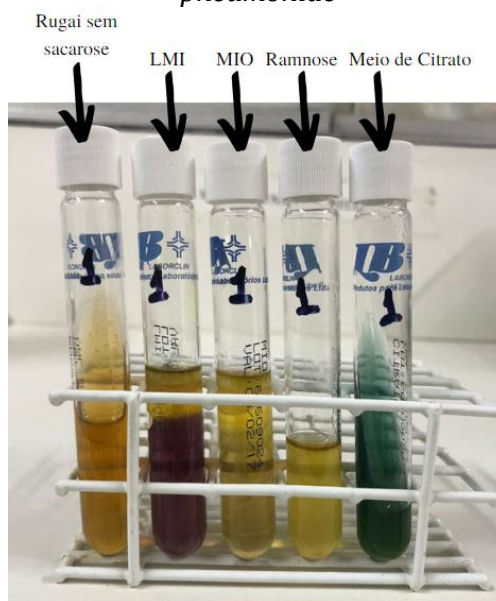


Fonte: A autora

5.2 ANÁLISE BIOQUÍMICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE *k. pneumoniae*

A Figura 18, mostra um exemplo visual do resultado obtido para as dez cepas *Klebsiella pneumoniae* utilizadas nesse estudo . Os resultados da caracterização bioquímica para este microrganismo constam na Figura 19.

Figura 18- Exemplo do resultado da identificação bioquímica das cepas de *Klebsiella pneumoniae*



Fonte: A autora.

Figura 19- Resultado da caracterização bioquímica para *K. pneumoniae*

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Desaminação do L-Triptofano	Fermentação da glicose	Produção de gás a partir da glicose	Produção de H ₂ S	Hidrólise da ureia	Descarboxilação da lisina	Descarboxilação da ornitina	Motilidade	Indol	Rhamnose (tubo 4)	Meio de Citrato (tubo 5)
LFBM-KPC (1)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
LFBM-KPC (2)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
LFBM-KPC (3)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
LFBM-KPC (4)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
LFBM-KPC (5)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
LFBM-KPC (6)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
LFBM-KPC (7)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
LFBM-KPC (8)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
LFBM-KPC (10)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
LFBM-KPC (11)	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+

Fonte: A autora.

Segundo KONEMAN et al, (2018), as cepas de *K. pneumoniae* apresentam um metabolismo muito ativo o que justifica sua capacidade de utilização de vários substratos como fonte de carbono. As provas de Desaminação do L-Triptofano, fermentação da glicose, produção de gás a partir da glicose, produção de H₂S e hidrólise da ureia, estão alocadas no tubo 1 referente ao meio de Rugai sem sacarose. Comprovam a característica fermentadora

desse microrganismo, bem como sua capacidade de hidrolisar a ureia, a positividade desse teste é indicada através de confirmação visual da alteração de cor do meio que originalmente era verde e passa para uma cor amarela devido à acidificação; no tubo dois (LMI), as cepas de *Klebsiella pneumoniae* apresentaram uma reação positiva para a descarboxilação da lisina, o que ocasionou a mudança da cor original do meio para púrpura; as cepas de *K. pneumoniae* apresentaram uma reação negativa para as provas de descarboxilação da ornitina, motilidade e produção de indol (tubo 3-MIO), a prova de indol é importante para a diferenciação bioquímica de *K. pneumoniae* da *K. oxytoca*, visto que a última citada, é produtora de indol (KONEMAN et al, 2018).

No meio de Ramnose (tubo 4), as cepas testadas apresentaram reação positiva com aparecimento de uma coloração amarela com turvação do meio; o teste de utilização de citrato como fonte de carbono (Meio de Citrato-tubo 5) apresentou reação positiva sem alteração da cor do meio para o azul. Entretanto, foi observado crescimento ao longo da estria de inoculação.

A leitura e interpretação dos testes bioquímicos foram realizadas com o auxílio das instruções do fabricante Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. E comparadas com o perfil bioquímico para *K. pneumoniae* apresentado por KONEMAN et al, (2018).

5.3 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A tabela 2, apresenta os perfis de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *K. pneumoniae* as drogas de escolha e uso convencional. Os resultados mostram que 100% das cepas apresentaram resistência a penicilina (amoxicilina + ácido clavulânico), a glicilciclina (tigeciclina) e para a cefalosporina de 3 geração (cefotaxima), já para a cefalosporinas de 4 geração (cefepime), esta última apresentou 80% de resistência, assim como carbapenêmico (meropenem).

Tabela 2 - Resultado do tamanho dos halos de inibição (mm) para cepas de *K. pneumoniae* e porcentagem de resistência a cada antimicrobiano.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMC (30 µg)	CPM (30 µg)	CTX (30 µg)	MER (10 µg)	TGC (15 µg)
LFBM – KPC (1)	0	14,20	10,67	12,47	4,44
LFBM – KPC (2)	0	10,53	10,42	11,42	0
LFBM – KPC (3)	0	0	0	4,21	3,93
LFBM – KPC (4)	0	0	0	9,07	7,70

LFBM – KPC (5)	0	0	0	12,63	8,96
LFBM – KPC (6)	0	9,90	10,89	0	7,72
LFBM – KPC (7)	0	0	0	10,80	7,26
LFBM – KPC (8)	17,17	23,31	27,37	18,23	9,91
LFBM – KPC (10)	7,02	16,97	17,03	9,86	7,90
LFBM – KPC (11)	8,76	4,51	8,37	16,33	3,91
Critério de resistência (halo em mm)	≤ 19	≤ 24	≤ 17	≤ 16	≤ 18
Resistência ao antimicrobiano (%)	100 %	100 %	80 %	80 %	100 %

LFBM- Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos; AMC– Amoxicilina + ácido clavulânico; CPM- Cefepime; CTX- Cefotaxima; MER– Meropenem; TGC– Tigeciclina.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE A BETA- LAPACHONA E ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAIS

O estudo foi realizado utilizando o método *overlay inoculum susceptibility disc*. Onde uma solução de β -lapachona de concentração 20.000 $\mu\text{g/mL}$, foi diluída em escala 1:10 de meio TSA- Tryptic Soy Agar, a fim de se obter uma concentração subinibitória da droga teste para *K. pneumoniae* de 4000 $\mu\text{g/mL}$.

Segundo a ANVISA, (2021), os testes de sensibilidade baseados no método de disco-difusão emitem o resultado qualitativo como “sensível, intermediário, resistente” ou em algumas situações, “não sensível”, sendo um ótimo teste para ser utilizado como parâmetro de triagem para a testagem de novas drogas e associações. Os resultados obtidos para este ensaio são apresentados no quadro 1 e nas Figuras 20 a 24, os gráficos apresentados foram construídos por meio do Excel.

Analisando os resultados obtidos no ensaio de atividade sinérgica dessa naftoquinona aos antimicrobianos convencionais, as cepas LFBM-KPC (1 e 3) mostrou sinergismo para os antimicrobianos MER e TGC com o percentual de aumento do Diâmetro da Zona de Inibição $\pm$ ESM variando de 23,56 a 25,76, e entre 33,37 a 33,47 respectivamente; a cepa LFBM-KPC (2) apresentou sinergismo apenas para TGC; a cepa LFBM-KPC (4) apresentou sinergismo para CPM, CTX e MER; LFBM-KPC (7) apresentou sinergismo para MER; LFBM-KPC (8) se apresentou sinérgica para CPM e CTX; LFBM-KPC (10) apresentou sinergismo para AMC e MER; enquanto a cepa LFBM- KPC (11) se mostrou sinérgica para quatro dos antimicrobianos convencionais sendo eles: AMC, CPM, CTX e TGC. No entanto, as cepas LFBM-KPC (5 e 6) se mantiveram resistentes mesmo em associação a β -lapachona.

O estudo de MACEDO, L. *et al*, (2013) comprova a atividade sinérgica entre naftoquinonas (Lapachol e beta-lapachona) e antimicrobianos convencionais no tratamento de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. Porém, falta de estudos que avaliem o efeito antimicrobiano da β -lapachona, bem como seu efeito sinérgico junto a antimicrobianos convencionais, frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente.

Os resultados positivos obtidos neste ensaio podem ser atribuídos a diversos fatores, como: a capacidade já conhecida que as naftoquinonas tem de aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio, onde estas por sua vez têm o poder de degradar lipídios, proteínas e ácidos desoxirribonucleicos, bem como, sua capacidade de formar complexos irreversíveis com aminoácidos nucleofílicos em proteínas, muitas vezes levando a inativação destas moléculas (MACEDO, L. *et al*, 2013). Essas características, atribuídas as naftoquinonas pode ter sido de extrema importância para os resultados sinérgicos positivos obtidos para as cepas LFBM-KPC (1, 2, 3, 4, 7, 8, 10 e 11) que mostraram um aumento percentual em seus halos de inibição.

Por outro lado, os resultados indiferentes podem ser explicados por uma interação antagônica da junção das características reativas da β -lapachona em conjunto as propriedades de cada antimicrobiano convencional usado. Assim como pode ser atribuído também, ao perfil de resistência apresentados pelas cepas de *K. pneumoniae* testadas, onde estas, podem manifestar-se mais sensíveis e mutáveis, que ao serem sensibilizadas ao meio contendo a droga teste podem ter se modificado criando uma resistência a esta, assim mantendo sua característica resistente.

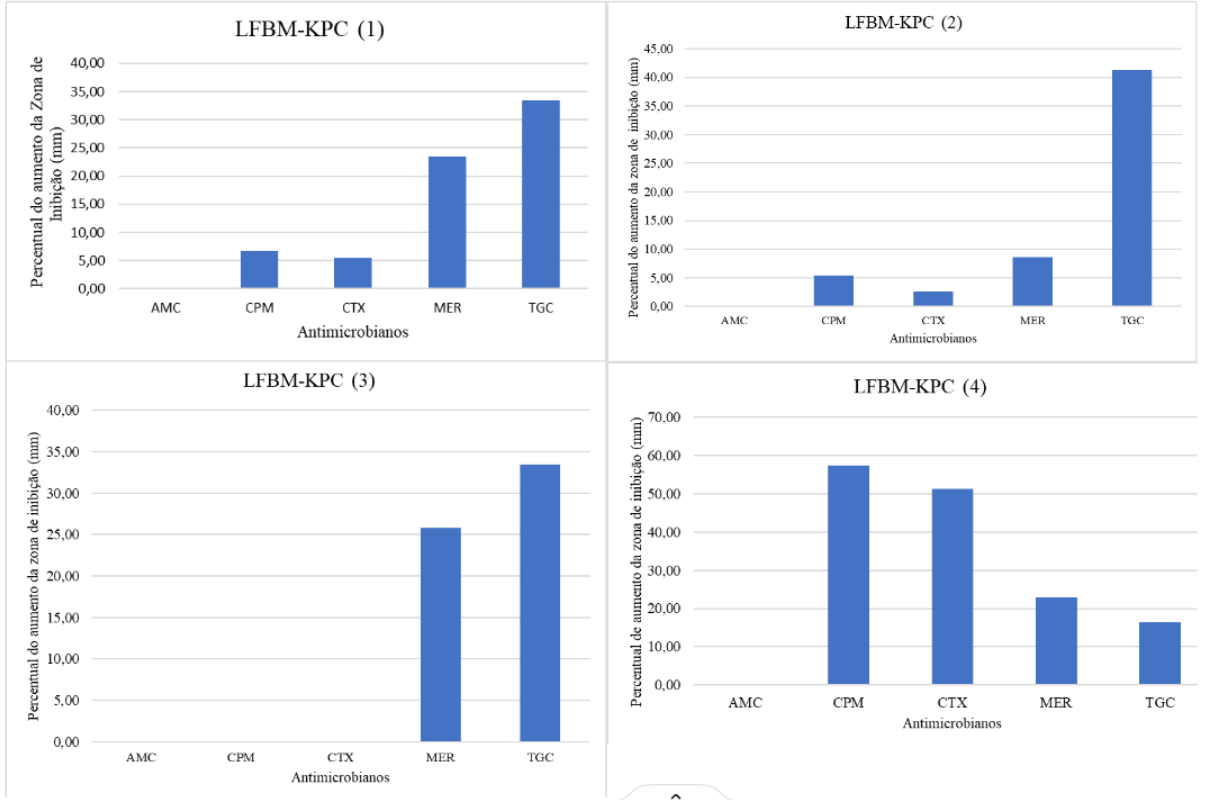
Quadro 1- Diâmetro da Zona de Inibição pelas cepas de *K. pneumoniae* e interpretação do efeito da associação entre beta-lapachona e antimicrobianos

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Drogas	Diâmetro da Zona de Inibição (DZI $\pm$ DP)		Percentual de aumento do Diâmetro da Zona de Inibição $\pm$ SEM	Interpretação
		Controle (mm)	Teste (mm)		
LFBM-KPC (1)	AMC	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	INDIFERENTE
	CPM	14,20 $\pm$ 0,20	12,92 $\pm$ 0,77	6,74 $\pm$ 3,0	INDIFERENTE
	CTX	10,67 $\pm$ 0,22	11,70 $\pm$ 0,47	5,42 $\pm$ 3,58	INDIFERENTE
	MER	12,47 $\pm$ 1,63	16,94 $\pm$ 0,19	23,56 $\pm$ 7,56	SINÉRGICO
	TGC	4,44 $\pm$ 4,44	10,78 $\pm$ 1,09	33,37 $\pm$ 17,63	SINÉRGICO

LFBM-KPC (2)	AMC	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	CPM	$10,53 \pm 1,20$	$11,57 \pm 0,51$	$5,44 \pm 3,66$	INDIFERENTE
	CTX	$10,42 \pm 0,20$	$10,10 \pm 0,30$	$2,61 \pm 1,72$	INDIFERENTE
	MER	$12,47 \pm 1,63$	$11,40 \pm 0,01$	$8,61 \pm 5,61$	INDIFERENTE
	TGC	0 ± 0	$7,84 \pm 0,21$	$41,25 \pm 1,07$	SINÉRGICO
LFBM-KPC (3)	AMC	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	CPM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	CTX	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	MER	$4,21 \pm 4,21$	$9,10 \pm 0,20$	$25,76 \pm 21,08$	SINÉRGICO
	TGC	$3,93 \pm 3,93$	$10,29 \pm 0,71$	$33,47 \pm 16,95$	SINÉRGICO
LFBM-KPC (4)	AMC	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	CPM	0 ± 0	$10,91 \pm 0,61$	$57,42 \pm 3,21$	SINÉRGICO
	CTX	0 ± 0	$9,75 \pm 0,17$	$51,23 \pm 0,99$	SINÉRGICO
	MER	$9,07 \pm 1,15$	$13,43 \pm 0,34$	$22,95 \pm 4,27$	SINÉRGICO
	TGC	$7,70 \pm 0,70$	$10,81 \pm 0,69$	$16,40 \pm 7,29$	INDIFERENTE
LFBM-KPC (5)	AMC	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	CPM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	CTX	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	MER	$12,63 \pm 2,05$	$14,86 \pm 0,02$	$11,71 \pm 10,87$	INDIFERENTE
	TGC	$8,96 \pm 0,40$	$9,57 \pm 1,06$	$3,45 \pm 3,19$	INDIFERENTE
LFBM-KPC (6)	AMC	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	CPM	$9,90 \pm 1,02$	$9,82 \pm 1,54$	$2,47 \pm 0,42$	INDIFERENTE
	CTX	$10,89 \pm 0,72$	$9,94 \pm 1,17$	$9,92 \pm 5,03$	INDIFERENTE
	MER	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	TGC	$7,72 \pm 0,88$	$9,59 \pm 0,50$	$9,82 \pm 7,24$	INDIFERENTE
LFBM-KPC (7)	AMC	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	CPM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	CTX	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	INDIFERENTE
	MER	$10,80 \pm 2,16$	$16,58 \pm 0,53$	$30,40 \pm 8,60$	SINÉRGICO
	TGC	$7,26 \pm 0,59$	$10,06 \pm 0,12$	$14,71 \pm 3,71$	INDIFERENTE
LFBM-KPC (8)	AMC	$17,17 \pm 2,13$	$18,87 \pm 0,50$	$8,98 \pm 8,58$	INDIFERENTE
	CPM	$23,31 \pm 1,72$	$18,96 \pm 0,12$	$22,87 \pm 9,66$	SINÉRGICO
	CTX	$27,37 \pm 2,02$	$20,09 \pm 1,44$	$42,08 \pm 14,40$	SINÉRGICO
	MER	$18,23 \pm 1,63$	$20,71 \pm 2,46$	$13,05 \pm 4,37$	INDIFERENTE
	TGC	$9,91 \pm 0,75$	$11,87 \pm 0,26$	$10,20 \pm 2,73$	INDIFERENTE
LFBM-KPC (10)	AMC	$7,02 \pm 7,02$	$14,51 \pm 0,90$	$39,42 \pm 32,21$	SINÉRGICO
	CPM	$16,97 \pm 3,30$	$17,98 \pm 2,98$	$5,29 \pm 1,71$	INDIFERENTE
	CTX	$17,03 \pm 4,34$	$19,53 \pm 2,73$	$13,16 \pm 8,48$	INDIFERENTE
	MER	$9,86 \pm 9,86$	$19,42 \pm 2,16$	$50,29 \pm 40,55$	SINÉRGICO
	TGC	$7,90 \pm 0,36$	$9,32 \pm 0,15$	$7,45 \pm 2,34$	INDIFERENTE
LFBM-KPC (11)	AMC	$8,76 \pm 1,43$	0 ± 0	$46,08 \pm 7,50$	SINÉRGICO
	CPM	$4,51 \pm 4,51$	0 ± 0	$23,74 \pm 23,74$	SINÉRGICO
	CTX	$8,37 \pm 1,64$	0 ± 0	$44,03 \pm 12,17$	SINÉRGICO
	MER	$16,33 \pm 1,27$	$17,32 \pm 1,21$	$5,21 \pm 0,32$	INDIFERENTE
	TGC	$3,91 \pm 3,91$	$8,93 \pm 0,56$	$26,42 \pm 17,63$	SINÉRGICO

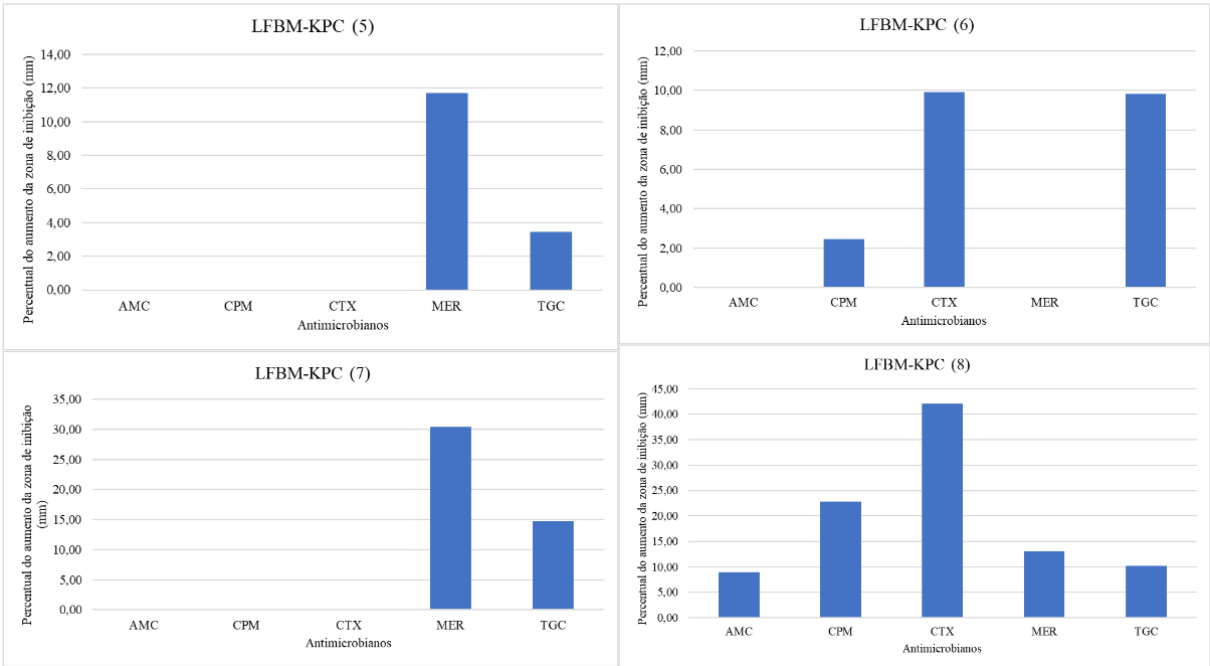
LFBM- Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos; AMC– Amoxicilina + ácido clavulânico; CPM- Cefepime; CTX- Cefotaxima; MER– Meropenem; TGC– Tigeciclina.

Figura 20- Aumento percentual da zona de inibição da associação beta-lapachona com discos de antimicrobianos



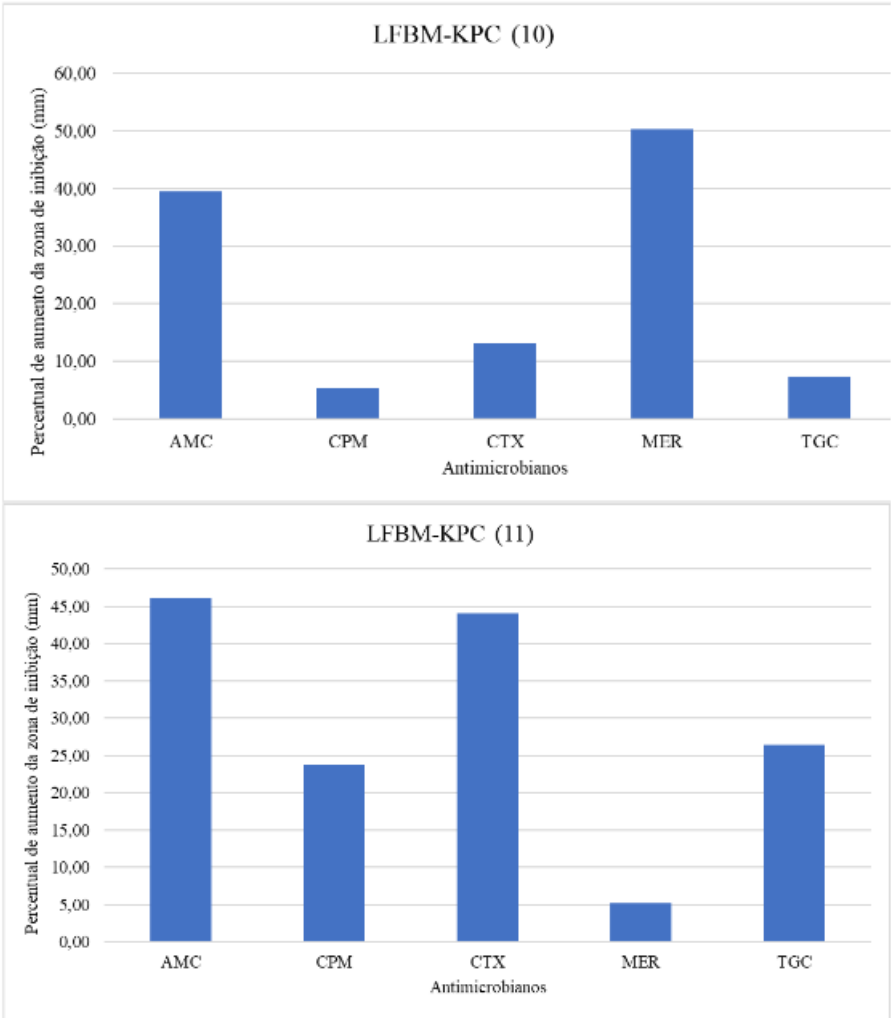
Fonte: A autora

Figura 21- Aumento percentual da zona de inibição da associação beta-lapachona com discos de antimicrobianos



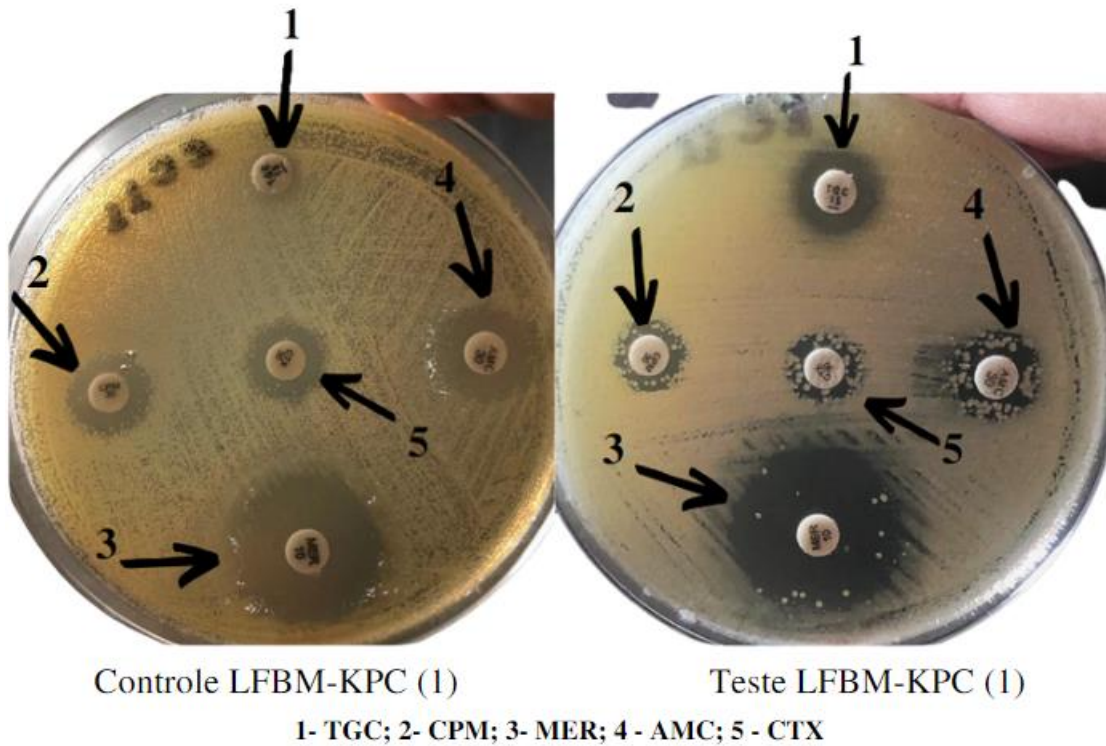
Fonte: A autora

Figura 22- Gráficos do aumento percentual da zona de inibição da associação beta-lapachona com discos de antimicrobianos convencionais



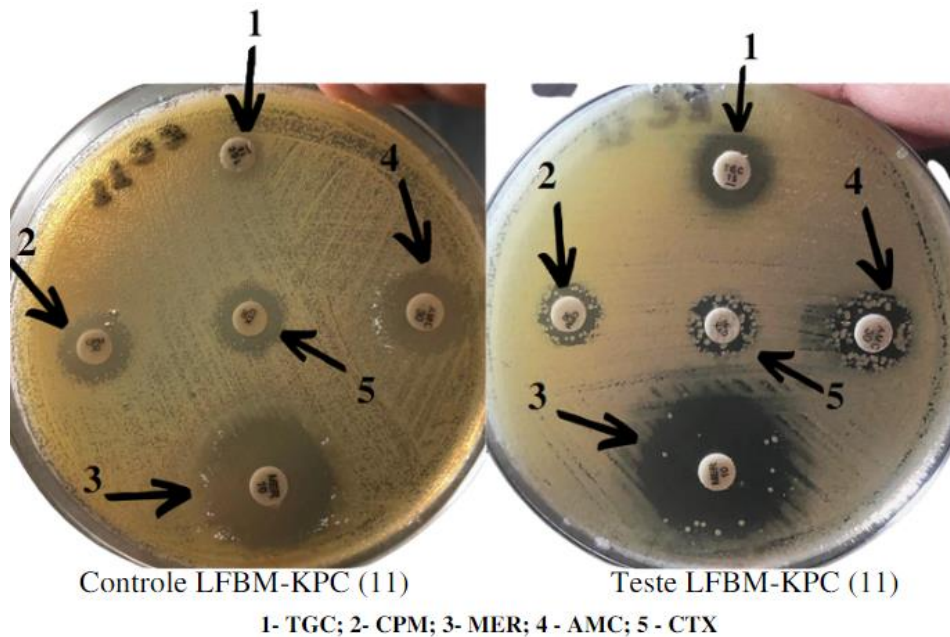
Fonte: A autora

Figura 23- Comparação entre controle e teste da cepa LFBM-KPC () para o teste de sinergismo entre beta-lapachona e convencionais



Fonte: A autora

Figura 24- Comparação entre controle e teste para o teste de sinergismo entre beta-lapachona e convencionais



Fonte: A autora

6. CONCLUSÃO

Das dez cepas de *Klebsiella pneumoniae* selecionadas para este estudo, oito se mostraram sensíveis a pelo menos uma das associações avaliadas β -lapachona - antimicrobianos.

Todas as cepas analisadas mostraram-se resistentes frente ao antimicrobiano amoxiciclina + ácido clavulânico.

A cepa LFBM-KPC (11) foi a que apresentou mais associações sinérgicas, como: β -lapachona -amoxiciclina + ácido clavulânico, cefepime, cefotaxima e tigeciclina.

A associação β -lapachona- meropenem, foi sinérgica sobre LFBM-KPC (1), LFBM-KPC (3), LFBM-KPC (4), LFBM-KPC (7), LFBM-KPC (10) E LFBM-KPC (11).

As LFBM-KPC (5) e LFBM-KPC (6) apresentaram resistência a todas as associações beta-lapachona- antimicrobianos.

Esses resultados podem servir de base para estudos futuros desta naftoquinona como um potencial agente antimicrobiano contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, Jaime Antonio; NOGUEIRA, J. M. R. Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenamases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. **Braz. J. Clin. Anal.**, v. 49, p. 240-244, 2017.
- AFONSO, Lucas Silva Rocha; MILLER-DA-SILVA, Leonardo Linhares; GARRIDO, Rodrigo Grazinoli. Estratégias terapêuticas para infecções por *Klebsiella pneumoniae* carbapeném resistente: uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e46211730296-e46211730296, 2022.
- ANVISA. Nota Técnica 01/2013. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes. Série. 2013.
- BARBOSA, Kledson Lopes; DE ARAÚJO, Fábio Ferreira; LINS, Dênis Fagner Souza. Antibioticoterapia com inibidores β -lactâmicos para ressensibilização de bactérias multirresistentes. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 32, n. 4, p. 329-335, 2020.
- BASSETTI, M. et al. Critically Ill patients study group of the european society of clinical microbiology and infectious disease (ESCMID); Hellenic Society of Chemotherapy (HSC) and Società Italiana di Terapia Antinfettiva (SITA). Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 24, n. 2, p. 133-144, 2018.
- BASSETTI, Matteo; PEGHIN, Maddalena. How to manage KPC infections. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 7, p. 2049936120912049, 2020.
- BATISTA, Aline Cristiane Cechinel Assing et al. **Klebsiella Pneumoniae: Análise Fenotípica e Molecular dos Mecanismos de Resistência KPC e NDM em um Hospital de Foz do Iguaçu, PR**. 2020. Dissertação de Mestrado. ALINE CRISTIANE CECHINEL ASSING BATISTA.
- CARVALHO, Mariana Fernandes et al. Pesquisa de atividades antimicrobiana, antibiofilme e antipersistência de derivados sintéticos de benzoquinona e naftoquinona contra *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina. 2020.
- CHUNG, Pooi Yin. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 20, p. fnw219, 2016.
- COGO, Laura Lúcia et al. Resistência às polimixinas em bactérias Gram-negativas: Uma revisão microbiológica. **Visão Acadêmica**, v. 15, n. 1, 2014.
- COLORAÇÃO DE GRAM - O QUE É BACTÉRIA GRAM-POSITIVA E GRAM-NEGATIVA. Kasvi, 2019. Disponível em: <https://kasvi.com.br/bacteria-gram-positiva-gram-negativa/>. Acesso em: 09 setembro de 2022.
- DA SILVA, Ana Maria Pereira et al. Biological activity of naphthoquinones from Bignoniaceae species. 2012.
- DA SILVA, Francisco Henrique et al. Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes.
- DE FIGUEREDO, Natália Aragão et al. Indústria farmacêutica e medicalização: uma reflexão sobre a democratização da saúde. **Homa Publica-Revista Internacional de Derechos Humanos y Empresas**, v. 4, n. 1, p. 070-070, 2020.
- DE FREITAS SOUZA, Jefferson; DIAS, Flavia Rodrigues; DE OLIVEIRA ALVIM, Haline Gerica. RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 5, n. 10, p. 281-293, 2022.
- DE SOUSA, Ana Beatriz Alves; RAMALHO, Fernanda Lobato; CAMARGO, Beatriz. Prevalência de Infecções nosocomiais ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em indivíduos hospitalizados. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 1915-1932, 2020.

DU, Jikun et al. Phenotypic and molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university teaching hospital, China. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95181, 2014.

ELIAS, Laura da Silva. Fatores de risco associados à mortalidade de pacientes tratados com polimixina b endovenosa. 2010.

ESCANDÓN-VARGAS, Kevin et al. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 15, n. 3, p. 277-297, 2017.

FERREIRA, Sabrina B. et al. beta-Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 140-160, 2010.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

KANO, Cecilia Hissami. Disseminação de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC): revisão epidemiológica. **Disseminação de Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC): revisão epidemiológica**, p. 38-38, 2020.

KONEMAN, Elmer W. et al. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA, 2018.

LABORCLIN. KIT ENTEROBACTÉRIAS. Laborclin, 2019. Disponível em: https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/kit_enterobacterias_bula_25012019.pdf. Acesso em: 12 de agosto de 2022.

LAISHRAM, Shakti et al. Uma atualização sobre a relevância técnica, interpretativa e clínica das metodologias de teste de sinergia antimicrobiana. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 35, n. 4, pág. 445-468, 2017.

LAN, Peng et al. A global perspective on the convergence of hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 25, p. 26-34, 2021.

LI, Bei et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. **Future microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071-1081, 2014.

LIMA, Raissa Ximenes. **Atividade antimicrobiana de terpenos e antibióticos convencionais e suas associações frente klebsiella pneumoniae produtoras de carbapenemase**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

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

MAGNET, Sofia; BLANCHARD, John S. Insights moleculares sobre a ação e resistência dos aminoglicosídeos. **Chemical reviews**, v. 105, n. 2, pág. 477-498, 2005.

MARTIN, Rebekah M.; BACHMAN, Michael A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 4, 2018.

MEMBRANA BRANCA, LISA, 0.22 μ m, 10 ENVELOPES COM 10 FILTROS E CARTÕES, ESTÉRIL. Merck Millipore, sem data. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/SO-Pak-Filters-0.22m-47mm-white-plain,MM_NF-GSWP047S0. Acesso em: 02 de agosto de 2022.

MENDES, Carlos Alberto Caldeira; BURDMANN, Emmanuel A. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, p. 752-759, 2009.

MONTEIRO, Jussimara et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.

NWORU, C. S.; ESIMONE, C. O. Comparative evaluation of three in vitro techniques in the interaction of ampicillin and ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 2, p. 605-611, 2006.

PACZOSA, Michelle K.; MECSAS, Joan. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PEREIRA, Natália. Virulência e patogenicidade de enterobactérias produtoras de ESBL (Beta lactamase de espectro estendido) isoladas de frango de corte, carne de frango e fezes humanas. 2020.

PEREIRA-MAIA, Elene Cristina et al. Tetracyclines and glycylcyclines: an overview. **Química Nova**, v. 33, p. 700-706, 2010.

PITOUT, Johann DD; NORDMANN, Patrice; POIREL, Laurent. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873-5884, 2015.

PORTA FILTRO TIPO STERIFIL EM POLISULFONA COMPLETO 47MM 250ML AUTOCLAVAVEL MERCK MILLIPORE. Loja Net Lab, sem data. Disponível em: <https://www.lojanetlab.com.br/papeis-especias/porta-filtro-tipo-sterifil-em-polisulfona-completo-47mm-250ml-autoclavavel-merck-millipore>. Acesso em: 02 de agosto de 2022.

PREVENÇÃO DE INFECÇÕES POR MICROORGANISMOS MULTIRRESISTENTES EM SERVIÇOS DE SAÚDE. Anvisa, 2021. Disponível em: <https://bit.ly/3d78Ton>. Acesso em: 26 de setembro de 2022.

RIBEIRO, Alexandra Manuela Ferreira. **Farmacologia dos antibióticos aminoglicosídeos**. 2017. Tese de Doutorado.

ROCHA, Rute Rodrigues. **Relatórios de Estágio e Monografia intitulada: "Klebsiella pneumoniae- Virulência e Resistência"**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra.

SILVA, Francisco Henrique. **Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes**. São José dos Pinhais: **Latin American Publicações**, 2020, V. 01. 367 p.

SOUSA, Eliane Teixeira; LOPES, Wilson A.; ANDRADE, Jailson B. de. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, p. 486-495, 2016.

TAVARES, Celisa Patrícia Moreira. **Klebsiella pneumoniae e fatores associados que contribuem para a resistência antimicrobiana: uma revisão de literatura**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

TRIMBLE, Michael J. et al. Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 10, p. a025288, 2016.

VERA-LEIVA, Alejandra et al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. **Revista chilena de infectología**, v. 34, n. 5, p. 476-484, 2017.

WANG, Guoying et al. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 17, p. 6278, 2020.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, 12: 3-7, 1999.