



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCENCIAS
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

Willyam Regio dos Santos Cruz

Atividade da beta-lapachona e antimicrobianos sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes pelo método *Overlay inoculum susceptibility disc*

Recife

2022

WILLYAM REGIO DOS SANTOS CRUZ

Efeito sinérgico da beta-lapachona e antimicrobianos sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes pelo 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.

Orientadora: Prof.º 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

Cruz, Willyam Regio dos Santos.

Efeito sinérgico da beta-lapachona e antimicrobianos sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes pelo método Overlay inoculum susceptibility disc / Willyam Regio dos Santos Cruz. - Recife, 2022.
40 : 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. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Beta-lapachona. 3. Sinergismo. 4. CIM. I. Ximenes, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo. (Orientação). II. Título.

500 CDD (22.ed.)

WILLYAM RÉGIO DOS SANTOS CRUZ

Efeito sinérgico da beta-lapachona e antimicrobianos sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes pelo 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.ª Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

Data de aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.ª Drª. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Raissa Ximenes Lima MSc

Universidade Federal de Pernambuco

Renan Andrade Fernandes de Souza MSc

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Sozinhos, nada somos, este trabalho, este degrau jamais seriam conquistados, se não fosse a oferta, a doação, a ajuda de todos aqueles os quais cito agradecendo:

A Deus, pela dádiva da vida, apoio nesta caminhada.

A minha família mesmo de longe sempre me dando apoio nessa jornada.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Eulália Ximenes, pelos ensinamentos acadêmicos e ensinamentos de vida; pela paciência, boa vontade, carinho e amizade durante toda a execução deste trabalho, pois grande foi sua luta, me ensinando guiando e acima de tudo educando.

Meu imensurável agradecimento aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de micro-organismo (LFBM) do Dept^o de Antibióticos da UFPE que sofreram, sorriram e torceram comigo nesta caminhada, em especial Hanne Queiroz, foram muitos acontecimentos que passamos juntos deste o PIBIC até agora no TCC, e aos demais amigos de Laboratório Gleyce, Lucianna, Licia, Amanda e Eduardo, obrigado pela amizade.

Aos amigos de curso pelas inúmeras risadas e lágrimas, que tivemos junto, em especial a Fernanda, obrigado pela amizade que tivemos deste o primeiro período da faculdade e aos meus ilustríssimos docentes do curso de Ciências Biológicas Bacharelado, pelos ensinamentos durante a graduação.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

*“Nós somos o que sonhamos ser
O mundo termina no dia da nossa morte...”*

Forget me Not - Elvenking

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa produtora de carbapenemase foi descrita pela Organização Mundial da Saúde como microrganismo “de prioridade 1” isto é, bactérias caracterizadas por possuir um perfil de resistência a múltiplos fármacos e para as quais as opções terapêuticas são extremamente limitadas. Diante deste fato, as naftoquinonas em especial a beta-lapachona, representam uma importante fonte de substâncias bioativas, ou seja, moléculas orgânicas de baixa massa molecular que apresentam uma ampla diversidade química e efeitos diversos sobre organismos vivos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana da beta-lapachona com antimicrobianos convencionais contra sete cepas de origem clínica de *Pseudomonas aeruginosa* com fenótipos de resistência previamente determinados. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27922 foi inserida como cepa padrão. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) desses compostos foram determinadas pelo método de macro diluição e o estudo das associações com antimicrobianos pelo método *Overlay inoculum susceptibility disc*. Todas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* no teste da CIM mostraram um perfil de resistência a todos os antimicrobianos avaliados, cujos valores variaram de 1024 a 32 µg/mL, com exceção da cepa LFBM H3 mostrou ser a mais sensível à beta-lapachona (CIM=32µg/mL). A maior parte das cepas apresentou CIM que variaram de 1024 a 128 µg/mL. Um efeito sinérgico da beta-lapachona com os antimicrobianos foi observado principalmente para a associação com a amicacina. A beta-lapachona foi capaz de inibir o crescimento das cepas de *P. aeruginosa* produtora de carbapenemase e pode servir de protótipo para futuros compostos com atividade antimicrobiana.

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*, Beta-lapachona, Sinergismo, CIM.

ABSTRACT

Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* has been described by the World Health Organization as a “priority 1” microorganism, that is, bacteria characterized by having a multidrug resistance profile and for which therapeutic options are extremely limited. Given this fact, naphthoquinones, especially beta-lapachone, represent an important source of bioactive substances, that is, organic molecules of low molecular mass that present a wide chemical diversity and diverse effects on living organisms. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of beta-lapachone with conventional antimicrobials against seven strains of clinical origin of *Pseudomonas aeruginosa* with previously determined resistance phenotypes. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27922 was inserted as a standard strain. The Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of these compounds were determined by the macro dilution method and the study of the associations with antimicrobials by the Overlay inoculum susceptibility disc method. All strains of *Pseudomonas aeruginosa* in the MIC test showed a profile of resistance to all antimicrobials evaluated, whose values ranged from 1024 to 32 µg/mL, with the exception of the LFBM H3 strain, which showed to be the most sensitive to beta-lapachone (MIC= 32µg/mL). Most strains presented MICs that ranged from 1024 to 128 µg/mL. A synergistic effect of beta-lapachone with antimicrobials was observed mainly for the combination with amikacin. Beta-lapachone was able to inhibit the growth of carbapenemase-producing *P. aeruginosa* strains and may serve as a prototype for future compounds with antimicrobial activity.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Beta-lapachone, Synergism, MIC.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 - Mecanismo de virulência e formação em infecções por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
Figura 2 - Formas isoméricas da naftoquinona.....	18
Figura 3 - Lapachol (1), α -lapachona (2) e β -lapachona (3) estruturas químicas.....	19
Figura 4 - Cristais de beta-lapachona.....	21
Figura 5 - Esquema do método de difusão em meio solido.....	23
Figura 6 - Na direita o controle e na esquerda o teste dos antimicrobianos com a beta-lapachona, cepa LFBM H3.....	30
Figura 7 - Na direita o controle e na esquerda o teste dos antimicrobianos com a beta-lapachona, cepa LFBM	30
Figura 8 - Na direita o controle e na esquerda o teste dos antimicrobianos com a beta-lapachona, cepa ATCC27922.....	31
Figura 9 - Na direita o controle e na esquerda o teste dos antimicrobianos com a beta-lapachona, cepa	31
Figura 10 - Atividade anti-pseudomonas da beta-lapachona em associação com discos de antimicrobianos avaliada pelo método <i>overlay inoculum susceptibility disc</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Antimicrobianos e critérios de classificação da resistência.....	21
Tabela 2 - Origem do isolamento, fenótipo de resistência aos antimicrobianos de cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e Concentração Inibitória Mínima da betalapachona.....	24
Tabela 3 – Atividade anti-pseudomonas/ da beta-lapachona em associação com discos de antimicrobianos avaliada pelo método <i>overlay inoculum susceptibility disc</i>	25

LISTA DE ABREVIATURAS

AMI – Amicacina;

ATM – Aztreonam;

COM – Cefepima;

CAZ – Ceftazidima;

CIP – Ciprofloxacino;

GET – Gentamicina;

IMP – Imipenem;

LEV – Levofloxacino;

MER – Meropenem;

PIT - Piperacillina/Tazobactam;

CIM – Concentração Inibitória Mínima;

UFC – Unidade Formadora de Colônia;

DZI – Diâmetro da Zona de Inibição

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	13
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	14
3.1 TRATAMENTO.....	17
3.2 NAFTOQUINONAS.....	17
3.3 BETA-LAPACHONA.....	18
3.4 MÉTODO <i>overlay inoculum susceptibility disc</i> , PARA O ESTUDO DE ASSOCIAÇÕES DE ANTIMICROBIANOS.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 MICRORGANISMOS E PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	20
4.2 AGENTE ANTIMICROBIANOS.....	20
4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	21
4.4 ASSOCIAÇÃO DA BETA-LAPACHONA E ANTIMICROBIANOS CONVENCIOAIS.....	22
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
5 RESULTADOS.....	23
5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	23
6 DISCUSSÃO.....	33
7 CONCLUSÕES.....	35
8 REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, não fermentador de glicose e ubiquitário. Em ambiente hospitalar comporta-se como um patógeno oportunista, capaz de causar sérias infecções principalmente em pacientes transplantados, internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) ou portadores de doenças crônicas como fibrose cística (AZAM et al., 2019). Trata-se uma bactéria que pode crescer em condições adversas como em equipamentos cirúrgicos, dispositivos intravasculares e suportes respiratórios. A formação de biofilme é um dos principais fatores de virulência que o torna resistente a descontaminação e está diretamente implicado no estabelecimento de infecção, na tolerância antimicrobiana, na resistência à resposta imunológica do hospedeiro e na disseminação da multirresistência a diversos fármacos, tornando-se uma grande ameaça no ambiente hospitalar (MORADALI et al., 2017).

A Organização Mundial da Saúde classificou *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos como microrganismo “de prioridade 1” isto é, bactérias caracterizadas por ter um perfil de resistência a múltiplos fármacos, para as quais as opções terapêuticas são extremamente limitadas (Organização Mundial da Saúde, 2017). Diante disso, a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos bem como novas abordagens terapêuticas são necessárias.

Neste cenário, surgem as naftoquinonas, metabólitos secundários de microrganismos, algas e plantas superiores com inúmeras propriedades farmacológicas (PANG et al., 2019, TAHARA et al., 2020, WELLINGTON et al., 2020). Associações entre metabólitos secundários e antimicrobianos tem sido uma alternativa para melhorar a eficácia desses últimos e são uma alternativa para tratar infecções causadas por microrganismos resistentes a vários fármacos, especialmente cepas multidroga resistentes (SILVA et al., 2009).

A beta-lapachona, (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona) é uma substância natural encontrada como constituinte minoritário do cerne de árvores da família *Bignoniaceae*, conhecidas no Brasil como ipês. Esta naftoquinona natural é conhecida desde 1858, e é facilmente extraída da serragem da madeira de espécies de ipês (FERREIRA et al 2010). Ou sintetizada a partir do lapachol ou lomatiol. Essa naftoquinona é conhecida por possuir uma variedade de propriedades farmacológicas,

incluindo atividades antitumorais, anti-inflamatórias, anti-tripanososoma e antimicrobianas (SILVA et al., 2009).

Nesse contexto, até o presente estudo na literatura apresenta apenas um trabalho sobre a associação da beta-lapachona com antimicrobianos de Araújo, 2015. Diante desse fato o trabalho em questão tem com finalidade avaliar em primeira parte a Concentração Inibitória Mínima da beta-lapachona frente a *Pseudomonas aeruginosa* e a segunda etapa desse trabalho foi de avaliar o efeito sinérgico da beta-lapachona em associação com antimicrobianos convencionais (Amicacina; Aztreonam; Cefepima; Ceftazidima; Ciprofloxacino; Ceftriaxona; Gentamicina; Imipenem), comumente usados no tratamento de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga-resistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana da beta-lapachona e de sua associação com antimicrobianos frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga-resistentes.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da beta-lapachona, frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*;

Associar a beta-lapachona em concentrações subinibitórias ($1/20 \times \text{CIM}$) a discos de antimicrobianos de amicacina, aztreonam, cefepima, cefatoxina, ceftriaxona ciprofloxacina, gentamicina e imipenem;

Determinar o tipo de efeito dessas associações sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo de forma reta ou ligeiramente curvos que apresentam motilidade por meio de um flagelo polar, são bactérias aeróbias estritas, utilizam glicose e outros carboidratos de forma oxidativa e são positivos para a citocromo oxidase biossintetizada pelo citocromo A₃ (ARAI, 2011).

O gênero *Pseudomonas* é classificado no domínio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Pseudomonadales* e família *Pseudomonaceae* (BRENNER et al., 2005), uma característica desse gênero é a sua capacidade de produzir um pigmento azul-esverdeado conhecido como piocianina-pioverdina, que os caracteriza como bacilo piociânico (DEBRITTO et al., 2020).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria que pode crescer sob condições adversas como por exemplo em equipamentos cirúrgicos, dispositivos intravasculares e suportes respiratórios. Este bacilo resiste à resposta imunológica do hospedeiro e quando portadores de genes de esta resistência, se dissemina facilmente aos diversos fármacos sendo uma grande ameaça para os pacientes, médicos e para-médicos (MORADALI et al., 2017), Essa bactéria tem distribuição mundial, pertence à microbiota normal de plantas e animais, podendo também causar infecções individuais em ambientes comunitários ou hospitalares, onde prevalece a circulação de cepas multirresistentes, produzindo quadros clínicos variando de infecção superficial da pele a sepsse fulminante (GONÇALVES et al., 2021).

Pacientes com queimaduras ou fibrose cística estão mais propensos à infecção por *Pseudomonas aeruginosa* devido ao seu estado de imunodepressão. No ambiente hospitalar essa bactéria se comporta como um microrganismo oportunista, capaz de causar sérias infecções principalmente em pacientes transplantados, internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) ou portadores de doenças crônicas como a fibrose cística (AZAM et al., 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, como: Imipenem, Meropenem, Tienamicina e Ertapenem, onde eles atuam inibindo a síntese de parede celular, o que desencadeia a morte da bactéria. Ela foi classificada como microrganismo “de prioridade 1” isto é, bactérias caracterizadas por ter um perfil de resistência a

múltiplos fármacos e para os quais as opções terapêuticas são extremamente limitadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE., 2017).

Pseudomonas aeruginosa apresenta uma série de fatores de virulência (Figura 1), sendo esses os principais responsáveis pela gravidade da infecção e o aumento da sua resistência no ambiente hospitalar (ROCHA et al., 2019). Um desses fatores é a produção de **alginato** um exopolissacarídeo composto pelos ácidos D-manurônico e L-glucurônico que é imprescindível à sobrevivência da bactéria por contribuir com a formação de biofilmes. O alginato é a principal causa do fenótipo mucóide das colônias isoladas de pacientes com infecções crônicas como na fibrose cística (MORADALI et al., 2017).

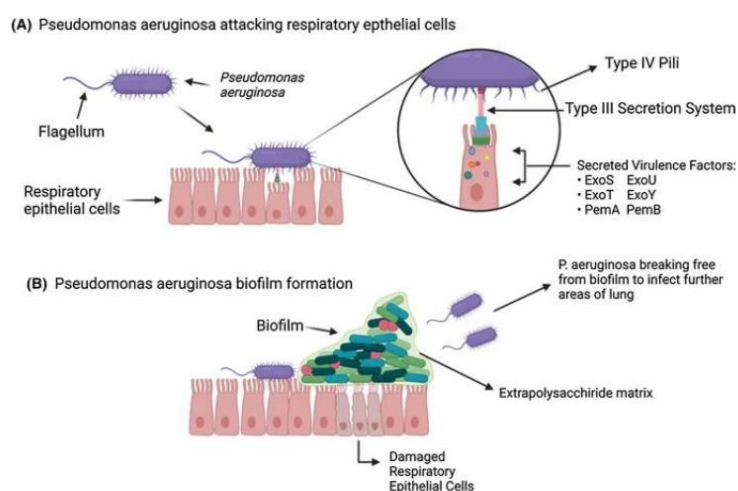


Figura 1 - Mecanismos de virulência e formação de biofilme em infecções por *Pseudomonas aeruginosa*

Fonte: REYNOLDS, KOLLEF, 2021.

P. aeruginosa possui um **flagelo** polar único, que lhe proporciona motilidade, adesão às células hospedeiras e formação de biofilmes (BUCIOR et al., 2012). Esses flagelos são altamente imunogênicos devido a presença de uma proteína específica a flagelina, que atua como um padrão molecular associado ao patógeno (PAMP), ativando receptores “toll like” (TLR 5) nas células hospedeiras e induzindo a imunidade inata estimulando assim, uma resposta inflamatória protetora que contribui para a eliminação do patógeno (CAMPODÓNICO et al., 2010). Nas camadas mais externas, *P. aeruginosa* possui apêndices denominados de **pili do tipo IV**, constituídos por inúmeras cópias de pequenas proteínas chamadas pilinas. Essas estruturas facilitam a adesão em células epiteliais do hospedeiro, colonização, maturação do biofilme, adesão em superfícies inertes (MARKO et al., 2018). A adesão bacteriana às células do hospedeiro é uma etapa importante para o estabelecimento da infecção e é realizada mediante

interações entre adesinas bacterianas e receptores de células humanas (REYNOLDS; KOLLEF, 2021).

O principal constituinte da membrana externa de bactérias Gram-negativas é o **lipopolissacarídeo (LPS)**, que estruturalmente apresenta três regiões: o lipídio A, de caráter hidrofóbico, responsável por ancorar o LPS à membrana externa; o oligossacarídeo central, que contribui para manter a integridade da membrana externa; e o antígeno O, que está em contato direto com o meio externo (MALDONADO et al., 2016; KAKOULLIS et al., 2021).

Os biofilmes são comunidades bacterianas altamente estruturadas, envolvidas por uma matriz extracelular que adere às superfícies bióticas ou abióticas. A maturação do biofilme de *P. aeruginosa* inicia pela adesão reversível da forma planctônica a uma superfície, envolvida por uma camada de proteínas. Dentro de 5 a 7 dias, a micro colônia de bactérias se multiplica e sua adesão se torna irreversível, aumentando a camada de proteínas e se multiplicando, produzindo a matriz polimérica e se transformando no biofilme maduro (DIAS, 2022). Essa matriz é composta principalmente por polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular e lipídios. Esta estrutura torna as condições mais favoráveis para a persistência da resistência bacteriana, uma vez que oferece proteção contra a resposta imune do hospedeiro e contra a terapia antimicrobiana (MAURICE et al., 2018). O biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* é caracterizado por ser resistente, apresenta polissacarídeos, DNA extracelular, proteínas e lipídios (GHAFOOR et al., 2011).

A Piocianina (N-metil-1-hidroxifenazina) metabólito secundário, de coloração azul-esverdeado, produzido em grandes quantidades por culturas ativas de *P. aeruginosa*. Caracteriza-se por ser um potente pigmento bacteriano com atividade de oxi-redução (DEBRITTO et al., 2020). Dentre as características de virulência da piocianina destaca-se que a indução de espécies reativas de oxigênio nas células do hospedeiro, levando ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, ao dano e morte celular. Também foi sugerido que a piocianina favorece o crescimento de biofilmes, promovendo interações entre células de *Pseudomonas aeruginosa* e as células do hospedeiro (ALATRAKTCHI et al., 2020).

Entre os mecanismos de virulência de *P. aeruginosa* está o **sistema de secreção tipo III**, que permite injetar proteínas efetoras na célula hospedeira e é imprescindível para a proteção do patógeno contra as respostas fagocíticas e inflamatórias. **As bombas de efluxo** são proteínas de transporte ativo localizadas ao longo da membrana

citoplasmática de *Pseudomonas aeruginosa* cuja função é a expulsão de substâncias tóxicas, como antibióticos e metabólitos secundários para fora da célula. Apresentam capacidade em reconhecer grande número de compostos devido às suas propriedades físico-químicas, sendo os antibióticos facilmente reconhecidos (NEVES et al., 2011).

3.1 Tratamento

Diferentes classes de antimicrobianos são utilizados para tratar infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, como beta lactâmicos, polimixinas e aminoglicosídeos. Por outro lado, temos uma longa lista de antibióticos ineficazes, devido ao fato da bactéria ganhado resistência a diferentes antibioticos (ABADI et al., 2019). Pesquisas indicam que os principais fatores relacionados com a diminuição da eficácia da antibioticoterapia, em hospitais e comunidades, é o uso excessivo de antimicrobianos e um sistema precários de controle de infecção e prevenção, sendo indispensável a busca de novas estratégias que minimizem este problema global que ameaça a humanidade (EICHENBERGER et al., 2019). Diante deste fato, a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos é essencial.

3.2 Naftoquinonas

As naftoquinonas possuem na sua estrutura básica dois anéis heterocíclicos oxigenados, podendo apresentar as formas isoméricas 1,2 ou orto-quinonoídica (carbonilas vizinhas e 1,4, ou para-quinonoídica (carbonilas separada por dois carbonos) (Figura 2) (TANDON; KUMAR, 2013). Apresentam propriedades biológicas incluindo ação antifúngica, antiprotozoária, antiviral e antibacteriana (RAVICHANDIRAN et al., 2019). Possuem efetiva ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em condições planctônicas, além de apresentar atividade contra biofilme de diversos microrganismos como *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (SARM) em diferentes estágios de formação (NOVAIS et al., 2018).

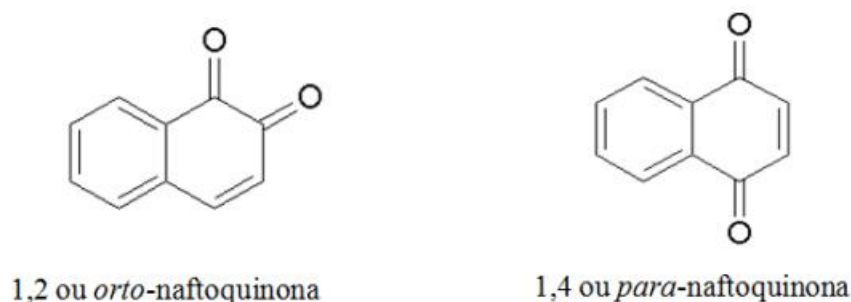


Figura 2 - Formas isoméricas da naftoquinona (TANDON E KUMAR, 2013).

O mecanismo de ação das naftoquinonas está relacionado à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, reactive oxygen species) onde, produzem ânions superóxidos responsáveis por induzir condições de hipóxia no meio intracelular, alterando o equilíbrio redox ou promovendo alquilação ou intercalação na dupla hélice do DNA (RAVICHANDIRAN et al., 2019).

3.3 Beta lapachona

A beta-lapachona, (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona) é extraída da casca de várias plantas brasileiras a exemplo do ipê - roxo (*Tabebuia avellanedae*) ou sintetizados a partir do lapachol ou lomatiol, que são conhecidos por possuir uma variedade de propriedades farmacológicas, incluindo atividades anti-helmínticos, antitumorais, anti-inflamatórias, anti-tripanosoma e antimicrobianas (DA SILVA et al., 2003).

A Beta-Lapachona é uma orto-naftoquinona (figura 3) de forma cristalina laranja-avermelhada com ponto de fusão de 154-156 °C, é termicamente estável até 191 °C (KIM et al., 2018). Sua solubilidade é independente de pH e praticamente insolúvel em água (0,038 mg/mL, 25 °C). É solúvel em acetonitrila, acetona e acetato de etila; discretamente solúvel em metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol e 2-butanol; e ligeiramente solúvel em propilenoglicol em temperaturas que variam de 25 a 45 °C. Em todos os solventes orgânicos, a solubilidade do β-lapachona aumenta com a temperatura (Kim et al., 2018).

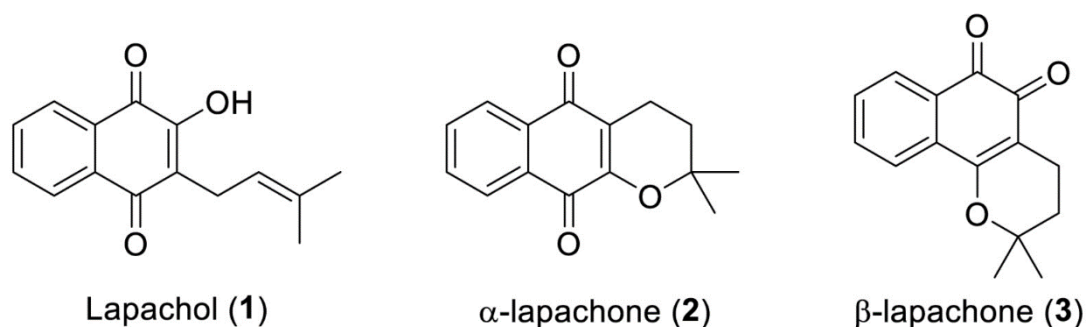


Figura 3 - Lapachol (1), α-lapachona (2) e β-lapachona (3) estruturas químicas.

A beta-lapachona pode ser extraída da casca do ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae*) e também pode ser obtida através de síntese orgânica a partir do lapachol, de outras naftoquinonas ou compostos aromáticos. A Beta-Lapachona consegue inibir a topoisomerase I e induzir a NADPH quinone oxidoreductase 1 (GOMES et al., 2021)

Este metabólito mostrou um efeito antimicrobiano contra larvas de *Toxocara canis* e sobre o verme adulto de *Schistosoma mansoni*, contra *Coccidioides posadasii*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* resistentes ao fluconazole, *Staphylococcus hemolyticus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e a *Mycobacterium tuberculosis* resistente à rifampicina (MORAES et al., 2018, XIMENES et al., 2004, SANTOS et al., 2019). Também apresenta um efeito sinérgico em associação com a vancomicina frente a *Enterococcus faecalis* (NUNES et al., 2017). A beta -lapachona em associação com a isoniazida demonstrou atividade bactericida contra duas espécies de *Mycobacterium fortuitum* e *M. smegmatis* (SILVA et al., 2009). Fernandes et al. 2020 observaram em microscopia eletrônica que a formação de biofilme de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* diminuía com a presença de beta-lapachona. Associações entre metabólitos secundários e antimicrobianos tem sido uma alternativa para melhorar a eficácia desses últimos e são uma opção para tratar infecções causadas por microrganismos resistentes a vários fármacos, especialmente *P. aeruginosa* multidroga resistentes para os quais, a terapia é limitada (NASR, 2020).

3.4 Método *overlay inoculum susceptibility disc*, para o estudo de associações de antimicrobianos

O método de *Overlay inoculum susceptibility disc*, baseia-se na incorporação no meio sólido de concentrações sub-inibitórias de um antibiótico. Numa outra camada o

microrganismo, é incorporado numa base de ágar fundido livre de antibióticos que é vertido para obter uma camada de inóculo de sobreposição. As placas do controle são preparadas sem antibiótico. Os discos de antimicrobianos são colocados sobre a placa e incubados por 24 horas.

Um aumento no diâmetro da zona de inibição (DZI) em relação ao controle de 19% corresponde à sinergia, <19% de sinergia corresponde ao efeito aditivo e nenhuma variação no DZI é um indicativo de indiferença (CHINWUBA et al., 1991).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e preparação do inóculo

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos (n= 7) foram escolhidas aleatoriamente e estão mantidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos–Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco. Esses microrganismos foram cultivados em caldo Mueller Hinton (MHB), incubados à 37° C por 24 horas. As culturas foram diluídas em solução salina esterilizada para ao final obter um inóculo de 10⁶ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL, que corresponde a 0,5 na escala de Mc Farland, onde foram confirmados por contagem da enumeração das colônias.

4.2 Agentes antimicrobianos

O lapachol foi extraído da serragem do ipê-roxo (*Tabebuia avellanae*). A extração de lapachol e a síntese da beta-lapachona (Figura 4), foi realizada no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco-Brasil, de acordo com a metodologia descrita por Lima e colaboradores em 1962. Os cristais de coloração avermelhada foram pesados analiticamente e solubilizados em etanol/tween80/H₂O (1,0/0,5/8,5 v/v).

Figura 4 - Cristais de beta-lapachona no centro na coloração laranja avermelhado em um recipiente roxo.



Fonte: O autor

Discos de antimicrobianos utilizados foram: amicacina, aztreonam, cefepima, cefatoxina, ceftriaxona ciprofloxacina, gentamicina e imipenem do laboratório de fabricante Laborclin foram utilizados nesse experimento. A resistência para esses antimicrobianos seguiu os critérios estabelecidos pelo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI 2020). Os critérios estabelecidos para classificação dos microrganismos resistentes e estão apresentados na tabela 1:

Tabela 1 – Antimicrobianos e critérios de classificação da resistência

Antimicrobiano	Concentração	Diâmetro da zona de inibição em milímetros (mm)
Amicacina	30µg	≤12
Aztreonam	30µg	≤15
Cefepina	30µg	≤14
Cefatoxina	30µg	≤14
Ceftriaxona	30µg	≤13
Ciprofloxacina	5µg	≤15
Gentamicina	10µg	≤12
Imipenem	10µg	≤15

4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada utilizando o método de macrodiluição, seguindo as recomendações estabelecidas pelo

CLSI (2020) com algumas modificações. Diluições seriadas da beta-lapachona foram preparadas de forma a obter concentrações que variaram de 1024 a 32 µg/mL. Ao final, a suspensão bacteriana padronizada, foi dispensada em todos os tubos. Uma avaliação antimicrobiana do sistema etanol/Tween 80/H₂O (1,0/0,5/8,5 v/v) foi incluído neste estudo, para excluir a possibilidade de efeitos tóxicos sobre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. A CIM é considerada como a menor concentração dos agentes antimicrobianos capazes de inibir o crescimento bacteriano após 24 h de incubação a 37°C. Após esse período foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônia/mL (UFC/mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 Associação da beta-lapachona e antimicrobianos convencionais

Para avaliação das associações de beta-lapachona com amicacina, aztreonam, cefepima, cefatoxina, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina ou imipenem foi utilizada a metodologia descrita por Laishram et al. 2017.

O procedimento experimental é foi basicamente uma modificação do método de difusão em meio sólido. Onde uma solução contendo a beta-lapachona em concentração equivalente a 1/20 da CIM foi incorporada ao ágar Mueller-Hinton e vertidos sobre as placas de petri. Em seguida, após total solidificação sobre ele é incorpora o microrganismo em meio sólido de ágar Mueller-Hinton calibrado de forma a conter 10⁶ UFC/mL. As placas foram postas em superfície plana até a solidificação. Em seguida, discos de amicacina, aztreonam, cefepima, cefatoxina, ceftriaxona ciprofloxacina, gentamicina e imipenem foram dispostos sobre à superfície do meio de forma equidistante. As placas foram incubadas à 37° por 24 horas. Um aumento no diâmetro da zona de inibição (DZI) em torno do disco de 19% em relação ao controle ou maior corresponde a um efeito sinérgico, <19% correspondem ao efeito aditivo e nenhuma variação do DZI é indicativo de indiferença (LAISHRAM et al 2017, NWORU 2006).

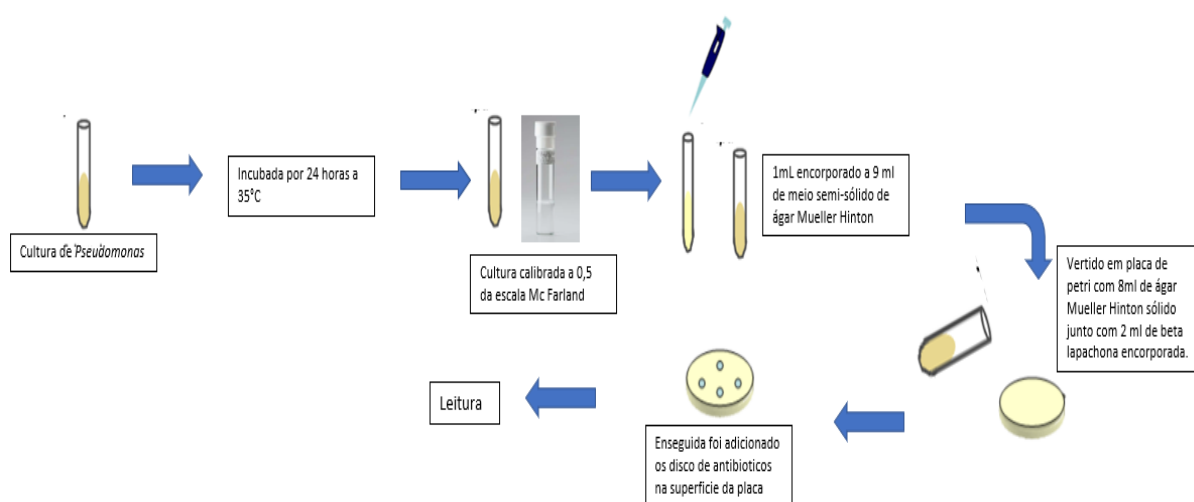


Figura 5 - Esquema do método de difusão em meio sólido com discos.

4.5 Análise estatística

A estatística será realizada pela análise de variância (ANOVA) utilizando GraphPad Prism versão 5.0 para o Windows, GraphPad software (San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os valores para a CIM da beta-lapachona estão apresentados na tabela 2 e a associação com os antimicrobianos frente as sete cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estão apresentados na tabela 3.

Tabela 2 - Origem do isolamento, fenótipo de resistência aos antimicrobianos de cepas *Pseudomonas aeruginosa* e Concentração Inibitória Mínima da beta-lapachona.

Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Origem	CIM da beta-lapachona (µg/mL)	Fenótipo de resistência determinado pelo Phoenix TM BD	SIR	Comentários
LFBM H3	Secreção Traqueal	128	AMI, GET, CIP, LEV, MER, IPM, CAZ, PIT	R	Potencial Produtor de Carbapenemase
LFBM H6	Ponta de Cateter	32	AMI, GET, CIP, LEV, MER, IPM, CPM, CAZ	R	-
LFBM H9	Secreção vascular	128	CIP, LEV, MER, IPM, CPM, CAZ, PIT, ATM	R	Potencial Produtor de Carbapenemase
LFBM H10	Urina	1024	-	R	Potencial Produtor de Carbapenemase
LFBM H15	Secreção Traqueal	128	AMI, GET, CIP, LEV, MER, IPM, CAZ, PIT	R	Potencial Produtor de Carbapenemase
ATCC 27922	Sangue	1024	-	R	Controle de qualidade
PAO1	Ferida	1024	-		Mutante produtor de biofilme

Amicacina (AMI); Aztreonam (ATM); Cefepima (CPM); Ceftazidima (CAZ); Ciprofloxacino (CIP); Gentamicina (GET); Imipenem (IPM); Levofloxacino (LEV); Meropenem (MER); Piperacillina/Tazobactam (PIT); SIR – Resistente (R); Sensível (S); Intermediário (I).

Tabela 3 – Atividade anti-pseudomonas da beta-lapachona em associação com discos de antimicrobianos avaliada pelo método *overlay inoculum susceptibility disc*.

Cepas	Antimicrobianos	Diâmetro de Zona de Inibição (DZI±DP)		Percentual de aumento do Diâmetro de zona de inibição ± DP	Interpretação
		Controle (mm)	Teste (mm)		
LFBM H3	AMI	0±0	0±0	0±0	Indiferença
	ATM	6,66±0,20	8,5±0,29	9,74±0,52	Aditivo
	CAZ	0±0	7,04±0,11	37,05±0,59	Sinérgico
	CIP	0±0	0±0	0±0	Indiferença
	CRO	0±0	0±0	0±0	Indiferença
	CPM	0±0	11,84±0,30	62,34±1,60	Sinérgico
	GET	0±0	0±0	0±0	Indiferença
	IPM	0±0	0±0	0±0	Indiferença
LFBM H6	AMI	0±0	9,09±0,30	47,81±1,60	Sinérgico

ATM	0±0	0±0	0±0	Indiferença
CAZ	0±0	7,04±0,11	37,05±0,59	Sinérgico
CIP	13,38±0,69	14,49±1,65	5,87±5,10	Aditivo
CRO	6,40±0,30	16,34±0,31	52,34±0,04	Sinérgico
CPM	0±0	0±0	0±0	Indiferença
GET	6,83±0,15	9,01±0,24	11,50±0,48	Aditivo
IPM	0±0	0±0	0±0	Indiferença

H9

AMI	6,91±0,28	14,21±0,23	38,42±0,23	Sinérgico
ATM	0±0	12,96±0,16	68,21±0,82	Sinérgico
CAZ	6,81±0,08	14,43±0,23	40,11±0,74	Sinérgico
CIP	0±0	14,04±0,24	73,90±1,27	Sinérgico
CRO	0±0	12,52±0,25	65,87±1,30	Sinérgico
CPM	0±0	12,59±0,35	66,27±1,86	Sinérgico
GET	6,61±0,04	11,94±0,11	28,05±0,37	Sinérgico

	IPM	0±0	0±0	0±0	Indiferença
H10	AMI	6,68±0,08	13,61±0,20	36,50±0,64	Sinérgico
	ATM	6,90±0,15	11,54±0,17	24,45±0,11	Sinérgico
	CAZ	6,89±0,01	9,99±0,30	16,34±2,35	Aditivo
	CIP	6,69±0,01	8,86±0,40	11,43±2,09	Aditivo
	CRO	0±0	0±0	0±0	Indiferença
	CPM	0±0	0±0	0±0	Indiferença
	GET	0±0	0±0	0±0	Indiferença
	IPM	0±0	0±0	0±0	Indiferença
H15	AMI	6,77±0,26	14,15±0,16	38,87±0,56	Sinérgico
	ATM	6,68±0,07	10,99±0,16	22,66±0,48	Sinérgico
	CAZ	6,65±0,13	9,28±0,47	13,82±1,82	Aditivo
	CIP	6,91±0,11	8,09±0,25	6,21±0,74	Aditivo
	CRO	0±0	0±0	0±0	Indiferença

	CPM	0±0	13,99±0,23	73,63±1,19	Sinérgico
	GET	6,7±0,1	10,83±0,23	21,74±0,67	Sinérgico
	IPM	0±0	0±0	0±0	Indiferença
ATCC 27922	AMI	6,64±0,03	14,71±0,45	42,47±2,53	Sinérgico
	ATM	8,12±0,74	13,35±0,17	27,53±2,98	Sinérgico
	CAZ	12,42±0,45	14,57±0,15	12,97±1,60	Aditivo
	CIP	13,08±0,78	14,54±0,10	10,58±3,57	Aditivo
	CRO	7,82±0,86	13,65±0,19	33,84±5,51	Sinérgico
	CPM	7,05±0,05	9,92±0,16	15,29±0,56	Indiferença
	GET	0±0	12,11±0,19	63,71±1	Sinérgico
	IPM	0±0	0±0	0±0	Indiferença
PAO 1	AMI	8,25±0,11	13,66±0,17	28,47±0,3	Sinérgico
	ATM	7,03±0,22	15,99±0,14	47,18±0,41	Sinérgico
	CAZ	7,88±0,27	13,06±0,11	27,56±0,82	Sinérgico

CIP	12,13±0,12	15,27±0,36	16,53±1,27	Aditivo
CRO	0±0	13,74±0,31	72,32±1,64	Sinérgico
COM	6,62±0,04	12,34±0,37	30,11±1,79	Sinérgico
GET	0±0	13,79±0,3	72,55±1,60	Sinérgico
IPM	0±0	0±0	0±0	Indiferença

Amicacina (AMI); Aztreonam (ATM); Cefepima (CPM); Ceftazidima (CAZ); Ciprofloxacino (CIP); Ceftriaxona (CRO); Gentamicina (GET); Imipenem (IPM).



Figura 6 - Na direita (A) demonstra o controle e na esquerda (B) demonstra o teste dos antimicrobianos com a beta-lapachona, cepa LFBM H3. Imipenen (1), Aztreonam (2), Ceftazidima (3), Cefepima(4), a seta aponta para o melhor resultado.



Figura 7 - Na direita (A) demonstra o controle e na esquerda (B) demonstra o teste dos antimicrobianos com a beta-lapachona, cepa LFBM H6. Imipenen (1), Aztreonam (2), Ceftazidima (3), Amicacina (4), a seta aponta para o melhor resultado.

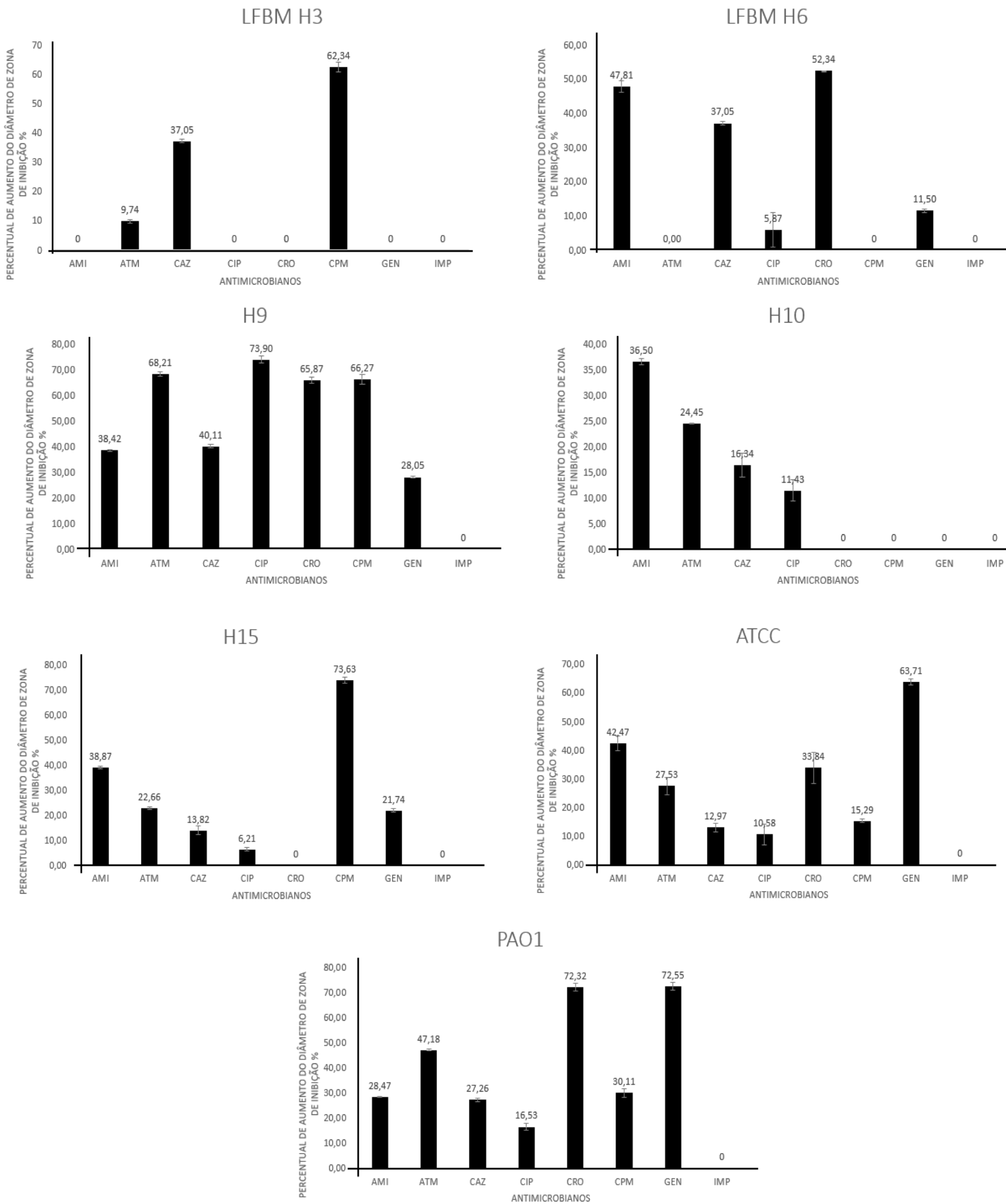


Figura 8 - Na direita (A) demonstra o controle e na esquerda (B) demonstra o teste dos antimicrobianos com a beta-lapachona, cepa ATCC27922. Ciprofloxacino (1), Ceftazidima (2), Imipenen (3), Gentamicina (4), a seta aponta para o melhor resultado.



Figura 9 - Na direita (A) demonstra o controle e na esquerda (B) demonstra o teste dos antimicrobianos com a beta-lapachona, cepa PAO 1. Ciprofloxacino (1), Amicacina (2), Cefepima (3), Gentamicina (4), a seta aponta para o melhor resultado.

Figura 10 - Atividade anti-pseudomonas da beta-lapachona em associação com discos de antimicrobianos avaliada pelo método *overlay inoculum susceptibility disc*.



Legenda: Amicacina (AMI); Aztreonam (ATM); Cefepima (CPM); Ceftazidima (CAZ); Ciprofloxacino (CIP); Ceftriaxona (CRO); Gentamicina (GET); Imipenem (IPM).

Os valores da Concentração Inibitória Mínima da beta-lapachona sobre as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* variaram de 1024 a 32 µg/mL. A cepa LFBM H6 mostrou ser a mais sensível cuja CIM foi 32µg/mL. Isso pode ter ocorrido devido a dois mecanismos de ação diferente um da beta-lapachona e o outro dos antimicrobiano utilizado.

Todas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mostraram um perfil de resistência para todos os antimicrobianos avaliados.

Os resultados para a associação entre a beta-lapachona em concentração sub-inibitória (51,2 ou 3,2 µg/mL) e discos de antimicrobiano da Amicacina, Aztreonam, Cefepima, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Ceftriaxona, Gentamicina, Imipenem frente a sete cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estão apresentadas na tabela 3.

Quase todas as associações mostraram-se sinérgicas, sendo caracterizadas por um aumento percentual do halo de inibição do crescimento microbiano que variou de 21,74 a 73,90%. Para algumas associações, principalmente com Imipenem, não foi observado aumento na atividade desse cabapenêmico, cujo efeito foi indiferente para todos os testes realizados.

Por outro lado, a associação com amicacina, apresentou um efeito sinérgico com um percentual maior que 28,47 %, exceto na cepa LFBM H3. A associação beta-lapachona com Ciprofloxacino, mostrou um efeito aditivo com exceção da cepa LFBM H3 que foi um efeito de indiferença e a cepa H9 onde essa associação apresentou um aumento de halo de inibição de 73,90% demonstrando um efeito sinérgico.

6 DISCUSSÃO

A *P. aeruginosa* é um patógeno nosocomial oportunista que causa sérias e complicadas infecções em pacientes imunocomprometidos. Este bacilo infecta principalmente o trato respiratório e o trato urinário. É o patógeno mais isolado de pacientes queimados e o que mais causa comum de infecções do ouvido externo (otite externa). É o colonizador mais frequente de dispositivos médicos (por exemplo, cateteres), além de ter uma versatilidade metabólica que o permite sobreviver sob condições hostis colonizando rapidamente diferentes habitats (PESANTEZ et al., 2022).

A bactéria *P. aeruginosa* é considerada a mais virulenta dentro da família *Pseudomonadaceae*, isso em razão dos fatores que a caracterizam, como: a capacidade de aderir às células hospedeiras através das fímbrias, a produção de polissacarídeos (alginato), as toxinas extracelulares e a presença de lipopolissacarídeos (LPSs) presente na parede celular (endotoxina) (MAYHALL, 1996).

Os antimicrobianos são compostos muito importantes quando se trata da sua administração nas infecções polimicrobianas. Os β -lactâmicos, aminoglicosídeos, polimixinas e fluoroquinolonas são os antimicrobianos mais utilizados para o tratamento das infecções por *P. aeruginosa* (ELSHAMY et al., 2020; HORCAJADA et al., 2019). Contudo, esta bactéria apresenta resistência a várias drogas devido a produção de enzimas inativadoras de antibióticos, a baixa permeabilidade em sua membrana externa, pela super expressão de proteínas de efluxo, pela modificação das suas porinas e por biossintetizar proteínas de ligação à penicilina (PBPs) (BUSH et al., 2016).

Neste trabalho foi observado que a beta-lapachona apresentou atividade anti-pseudomomas. Esses resultados corroboram ao de Araújo 2015, onde ele apresentou variação da Concentração inibitória mínima da beta-lapachona frente a *P. aeruginosa* valores que variaram de 160 a 640 $\mu\text{g/mL}$.

A associação da beta-lapachona, utilizada em concentração sub-inibidora (51,2 a 3,2 $\mu\text{g/mL}$) à fármacos da classe dos aminoglicosídeos (Amicacina e Gentamicina) que atuam na inibição da síntese das proteínas, as fluorquinolonas (ciprofloxacino) atuam na inibição da DNA girase, gerou um efeito sinérgico, inibindo o crescimento da maior parte das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas.

Das sete cepas de *P. aeruginosa*, seis foram sensíveis a associação beta lapachona-amicacina exceto LFBM H3, que apresentou um percentual do diâmetro da zona de inibição menor que 19%, sendo um efeito de indiferença para esse antimicrobiano.

O Imipenem, um carbapenemico, apresentou um efeito de indiferença frente as cepas testadas, onde não foi observado nenhum aumento no percentual de inibição do crescimento, demonstrando assim que essa associação se torna ineficiente para inibi o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Dentre as sete cepas avaliadas, com a associação de fármacos e a beta- lapachona todas tiveram uma ou mais associação onde apresentaram um aumento no percentual da zona de inibição superior a 19%. Com o fármaco da classe das fluoroquinolonas (Ciprofloxacino)

todas as cepas apresentaram em sua maioria um efeito aditivo com exceção da com exceção da cepa LFBM H3 com um efeito indiferente e a cepa H9 onde essa associação apresentou um aumento de halo de inibição de 73,90% demonstrando um efeito sinérgico. Esta observação deve-se provavelmente a adição de dois mecanismos de ação distintos, o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio que danificam os lipídios presentes na parede e na membrana, bem como nas proteínas e no ácido desoxirribonucleico.

7 CONCLUSÕES

A β -lapachona foi capaz de inibir o crescimento das cepas de *P. aeruginosa* com potencial de produção de carbapenemase, onde a concentração inibitória mínima variou de 1024 a 32 $\mu\text{g/mL}$. A grande maioria de interações da beta-lapachona e os antimicrobianos apresentou efeito sinérgico nas cepas testadas. Assim, esses resultados podem servir de base para estudos futuros desta molécula como um potencial agente antimicrobiano contra *P. aeruginosa* multidroga resistentes.

8 REFERENCIAS

ABADI, A. T. B.; RIZVANOV, A.; HAERTLÉ, T.; BLATT, N. World Health Organization report: current crisis of antibiotic resistance. *BioNanoScience*, v. 9, n. 4, p. 778-788, 2019;

ALATRAKTCHI, F. A.; SVENDSEN, W. E.; MOLIN, S. Electrochemical detection of pyocyanin as a biomarker for *Pseudomonas aeruginosa*: A focused review. *Sensors*, v. 20, n. 18, p. 5218, 2020;

Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol* vol. 37, pp.177-192, 2019;

ARAI, H. Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. V. 2 P. 1-13, 2011;

ARAÚJO, K. F. Efeito Sinérgico da β -lapachona em associação com antimicrobianos convencionais frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e inibição de fatores de virulência: biofilme e piocianina. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia – Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2015;

AZAM, M. W.; KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, V. 24:1, P. 350-359, 2019;

BRENNER, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology The Proteobacteria Part A Introductory Assays*, Springer, New York, NY, USA. V. 2, P. 304, 2005;

BUCIOR, I.; PIELAGE, J.F.; ENGEL, J.N. *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS Pathog.* 2012, 8, e1002616;

BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 6, n. 8, p. a025247, 2016;

CAMPODÓNICO, V.L.; LLOSA, N.J.; GROUT, M.; DORING, G. MAIARA-LITRÁN, T.; PIER, G.B. Evaluation of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines. *Infect Immun*, V. 78(2): P. 746-55, 2010;

CHINWUBA, Z.G.; CHIORI, C.O.; GHOBASHY, A.A.; OKORE, V.C. Determination of the synergy of antibiotic combinations by an overlay inoculum susceptibility disc method. *Arzneimittelforschung*, V. 41: P. 148-50, 1991;

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th informational supplement. CLSI document M100-S29. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2019;

DA SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. *Rev. Química Nova*, V. 26:3; P. 407-416, 2003;

DIAS, B. B. Modelagem farmacocinética populacional da tobramicina em infecções pulmonares pré-clínicas agudas e crônicas por *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biofilme mucoide e não-mucoide. Dissertação de Mestrado apresentada por Bruna Bernar Dias para obtenção do título de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE FARMÁCIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2022;

DEBRITTO, S.; GAJBAR, T. D.; SATAPUE, P.; SUNDARAM, L.; LAKSHMIKANTHA, R. Y.; JOGAIAH, S.; ITO, S. I. Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020;

EICHENBERGER, E. M.; THADEN, J. T. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant Gram-negative bacteria. *Antibiotics*, v. 8, n. 2, p. 37, 2019;

ELSHAMY, A. A.; ABOSHANAB, K. M. A. review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection and treatment options. *Future Science OA*, v. 6, n. 3, p. FSO438, 2020;

PESANTEZ, D. I. E.; SANCHEZ, G. F. E. Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Rev. chil. infectol.*, Santiago, v. 38, n. 1, p. 69-80, feb. 2021. Disponible en. accedido en 11 marzo 2022;

FERNANDES, A. W. C.; SANTOS, V. L. A.; ARAÚJO, C. R. M.; OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. Anti-biofilm Effect of β -Lapachone and Lapachol Oxime Against Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* V. 77, P. 204–209, 2020;

FERREIRA, S. B.; GONZAGA, D. T. G.; SANTOS, W. C.; AARAÚJO, K. G. L.; FERREIRA, V. F. β -Lapachona: Sua Importância em Química Medicinal e Modificações Estruturais. *Rev. Virtual Quim.* V. 2: P. 140-160, 2010;

GOMES, C. L.; SALES, V. A. W.; MELO, C. G.; SILVA, R. M. F.; NISHIMURA, R. H. V.; ROLIM, L. A.; ROLIM, P. J. Beta-lapachone: natural occurrence, physicochemical properties, biological activities, toxicity and synthesis. *Phytochemistry*, v. 186, p. 112713, jun. 2021;

GONÇALVES, B; GOULART, N. Principais aspectos da *Pseudomonas aeruginosa* – revisão bibliográfica. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto ao Curso de Ciências Biológicas - Modalidade Médica, da Escola de Ciências Médica, Farmacêuticas e Biomédicas, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel. 2021;

GHAFOOR, A.; HAY, I. D.; REHM, B. H. Papel de exopolysacarídeos em *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Acento. Microbiol.* V. 77: P. 5238-5246, 2011;

HORCAJADA, J. P.; MONTERO, M.; OLIVER, A.; SORLÍ, L.; LUQUE, S.; GÓMEZ-ZORRILA, S.; BENITO, N.; GRAU, S. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical microbiology reviews*, v. 32, n. 4, p. e00031-19, 2019;

KAKOULLIS, L.; PAPACHRISTODOULOU, E.; CHARA, P.; PANOS, G. Mechanisms of antibiotic resistance in important gram-positive and gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. *Antibiotics*, v. 10, n. 4, p. 415, 2021;

KIM, ki Hyun; OH, Hee Kyung; HEO, Bora; KIM, Nam Ah; LIM, Dae Gon; JEONG, Seong Hoon. Solubility evaluation and thermodynamic modeling of β -lapachone in water and ten organic solvents at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria*, v. 472, p. 1-8, set. 2018;

LAISHRAM, S.; PRAGASAM, A. K.; BAKTHAVATCHALAM, Y. D.; VEERARAGHAVAM, B. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. *Indian J Med Microbiol*, V. 35, P. 445-68, 2017;

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

MAURICE, N. M.; BEDI, B.; SADIKOT, R. T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, v. 58, n. 4, p. 428-439, 2018;

MARKO, V. A.; KILMURY, S. L. N.; MACNEIL, L. T.; BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* type IV minor pilins and PilY1 regulate virulence by modulating FimS-AlgR activity. *Plos Pathogens*. 2018 May;14(5): e1007074;

- MAYHALL, C.G. Hospital Epidemiology and Infection Control. 1 Ed. Lippincott Williams & Wilkins; 1996;
- MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. Front Cell Infect Microbiol. vol. 15;7-39 2017;
- MORADALI, M. Fata; GHODS, Shirin; REHM, Bernd H. A. Activation mechanism and cellular localization of membrane-anchored alginate polymerase in *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and environmental microbiology, v. 83, n. 9, p. e03499-16, 2017;
- MORAES, D.C.; CURVELO, J.A.R; ANJOS, C.A.; MOURA, K.C.G.; PINTO, M.C.F.R.; PORTELA, M.B.; SOARES, R.M.A. β -lapachona e α -nor-lapachone modulam fatores de viabilidade e virulência de *Candida albicans* J. Mycol. Med., V. 28, P. 314-319, 2018;
- NASR, P. Genetics, epidemiology, and clinical manifestations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Hospital Infection. V. 104, P. 4-11, 2020;
- NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 47, p. 409-420, 2011;
- NUNES, L. E.; CAMPELO, P.; XIMENES, E. C. P. A. Synergistic effect between beta-lapachone and vancomycin on *Enterococcus faecalis* strains. In: 29º congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu. 29º congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu, 2017;
- NWOGU, C.S.; SEIMONE, 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 nº 2, P. 605-611, 2006;
- Organização Mundial da Saúde. 2017. OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. Retirado de https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812. Acesso em: 29 julho. 2022;
- PANG, Z.; RAUDONIS, R.; GLICK, B.; LIN T. J.; CHENG, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnology advances, V. 37, n. 1, P. 177-192, 2019;
- RAVICHANDIRAN, P.; MASLYK, M; SHEET, S; JANECHKO, M; PREMNATH, D; KIM, A.R.; PARK, B.H.; HAN, M. K.; YOO, D. J. Synthesis and antimicrobial evaluation of 1,4-naphthoquinone derivatives as potential antibacterial agents. ChemistryOpen. V. 8(5): P. 589–600, 2019;
- REYNOLDS, D.; KOLLEF, M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. Drugs, v. 81, n. 18, p. 2117-2131, 2021;
- ROCHA, A. J.; BARSOTTINI, M. R. O.; ROCHA, R. R.; LAURINDO, M. V.; MORAES, F. L. L.; ROCHA, S. L. *Pseudomonas Aeruginosa*: Fatores de Virulência e Genes de Resistência a Antibióticos. Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia [online]. V. 62, 2019;

SANTOS, V. H. B.; FREITAS, J. L. N.; XIMENES, E. C. P. A.; ROLIM, P. J. N.; AIRES, A. L.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. Avaliação in vitro do potencial esquistossomicida da beta-lapachona no complexo de inclusão beta ciclodextrina. In: I Coloquio Regional em Morfotecnologia, 2019, RECIFE. Revista Eletrônica Acervo de Saúde. Goias: editora Acervo saúde, 2019;

SILVA, J. L.; MESQUITA, A. R. C.; XIMENES, E. C. P. A. In vitro synergic effect of b-lapachone and isoniazid on the growth of *Mycobactsendo umaunitum* and *Mycobacterium smegmatis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso), v. 104, p. 580-582, 2009;

TAHARA, T.; WATANABE, A.; YUTAMI, M.; YAMANO, Y.; SAGARA, M.; NAGAI, S.; SAITO, K.; YAMASHITA, M.; IHARA, M.; IIDA, A. STAT3 inhibitory activity of naphthoquinones isolated from *Tabebuia avellaneda*. Bioorganic & Medicinal Chemistry. V. 28, P. 115347, 2020;

TANDON, V. K.; KUMAR, R. Recent development on naphthoquinone derivatives and their therapeutic applications as anticancer agents. Expert Opin Ther Pat. V 23(9):1087-108.2013;

XIMENES, E. C. P. A.; SILVA, J. L. In vitro bacterial activity of beta-lapachone alone and in combination against *Mycobacterium fortuitum*. In: I Encontro Nacional de Tuberculose, 2004, Brasília -DF. Anais do I Encontro Nacional de Tuberculose, 2004;

WELLINGTON, K.W.; KOLESNIKOVA, N.I.; HLATSHWAYO, V.; SAHA, S. T.; KAUR, M.; MOTADI, L. R. Anticancer activity, apoptosis and a structure–activity analysis of a series of 1,4-naphthoquinone-2,3-bis-sulfides. Investigational New Drugs. V. 38, P. 274–286, 2020.