



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

Vitória Gabriella de Almeida Maranhão

**Associação do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* (Mart.
Ex Hayne) e antimicrobianos sobre cepas de *Enterococcus faecalis*
resistentes à vancomicina**

Recife

2023

VITÓRIA GABRIELLA DE ALMEIDA MARANHÃO

Associação do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* (Mart. Ex Hayne) e antimicrobianos sobre cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina

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.a Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Recife

2023

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

Maranhão, Vitória Gabriella de Almeida .

Associação do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* (Mart. Ex Hayne) e antimicrobianos sobre cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina / Vitória Gabriella de Almeida Maranhão. - Recife, 2023.

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, 2023.

1. Microbiologia. 2. Sinergismo. 3. *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina . 4. *Hymenaea stigonocarpa* . 5. Associação. I. Ximenes, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

VITÓRIA GABRIELLA DE ALMEIDA MARANHÃO

Associação do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* (Mart. Ex Hayne) e antimicrobianos sobre cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina

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 Dr.^a. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque PhD

Universidade Federal de Pernambuco

Renan Andrade Fernandes de Souza MSD

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, o agradecimento mais especial vai para minha orientadora Prof.^a Dr.^a, Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes. Gosto de praticar a gratidão com pessoas extraordinárias que aparecem na minha vida e professora, a senhora se tornou um exemplo para mim durante todo esse processo. Um coração fantástico, paciente, move rios e mares para ajudar seus alunos durante o processo... com certeza a senhora se eternizou na minha vida acadêmica. Lhe admiro desde o primeiro período, quando entrei com os olhinhos brilhando dentro da Universidade e a senhora sempre gentil dando aula de Microbiologia e eu nunca esqueci desses momentos, sempre foi minha primeira opção de orientadora de TCC, obrigada por ter me escolhido também.

Ao meu grande amigo durante a graduação, Nicholas Luiz de Oliveira Cavalcanti Medeiros, por toda parceria durante o processo de produção desse trabalho, desde o início da graduação como calouros sonhadores e finalizando esse ciclo dois adultos trabalhadores e cheios de sonhos também. Obrigada por ter tornado tudo mais leve nesse processo, por todo companheirismo, pelas idas ao laboratório nos feriados, pelas lavagens de tubos que renderam risadas, pelos momentos estressantes que também fazem parte do processo.

À Prof.^a Dr.^a, Monica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque e ao Ms., Renan Andrade Fernandes de Souza, por estarem presente na apresentação desse trabalho e terem aceitado o convite de serem examinadores da banca. Será uma honra ter meu trabalho avaliado por vocês, obrigada!

À minha família, por toda vibração positiva desde quando anunciei que tinha passado na UFPE para me tornar bióloga. Por terem acompanhado, mesmo de longe, todo meu processo, por me enxergarem como potencial dentro de tudo isso. Ao meu pai, Paulo Cezar Maranhão da Silva, por ter me apoiado em escolher o curso dos meus sonhos e confiar em mim. Em especial, a minha vó, Eliane Maranhão da Silva, que sempre acreditou em mim. Vó, sua primeira neta em breve estará se tornando Bióloga pela Universidade Federal de Pernambuco! Tudo em mim tem um pouco de ti, tenho orgulho em ser criada por vó. À minha madrastra, Jacqueline Santos Olegário, por me escutar todos os dias, por ser um exemplo de mulher e profissional para mim, tudo em mim tem um pouco de ti também! Lhe admiro imensamente, obrigada por tudo!

Aos meus grupos de amigos, ao grupo Turma da Inbonha (Débora, Gabriela, Hauanna, Jayrla, Jenyfer, Luana, Sabrina, Samantha e Thamirys) e, ao grupo Biodesagradáveis (Débora, Nicholas, Rafael, Samantha, Tonny e Yasmim), por tornarem minha graduação mais leve, por terem segurado minha mão em todos os momentos, pelos estudos juntos, pelas risadas gostosas durante o cotidiano, pelos almoços, pelas festas e por acreditarem em mim. Não seria a mesma coisa sem vocês, obrigada a cada um de vocês por ter me deixado só com boas memórias dessa graduação.

Aos meus amigos pessoais e do trabalho, por serem escuta, por estarem acompanhando esse processo de pertinho e por me acalmarem em todos os momentos. Em especial, Júlia Talita Medeiros Lins de Lima, por ter estado comigo desde o ensino médio e estarmos finalizando a minha graduação juntas, pelas madrugadas acordada comigo me ajudando nesse processo e por ser uma rede de apoio essencial na minha vida. As minhas amigas e colegas de trabalho, Brenda Regina de Lima Fabrício e Déborah Maria Soares Ramos, obrigada por estarem me apoiando desde o início e por acreditarem em mim.

RESUMO

Enterococcus faecalis estão presentes no trato gastrointestinal de mamíferos e causam sérias infecções nosocomiais como endocardite e septicemia. O surgimento de cepas de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (ERV) é um grave problema de saúde pública, uma vez a antibioticoterapia é ineficaz e restrita a poucos fármacos. O tratamento é restrito à tigeciclina, daptomicina, carbenicilina e estreptomicina. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do Extrato Hidroalcolico da *Hymenaea stigonocarpa* (EHHS) e quatro antimicrobianos (carbenicilina, estreptomicina, tigeciclina e vancomicina) para os quais as oito cepas de *Enterococcus faecalis* se mostraram resistentes (LFBM EF 222, LFBM EF 271, LFBM EF 280, LFBM EF 288, LFBM EF 354, LFBM EF 421, LFBM EF 918, e ATCC 51291). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EEHS foi de 512µg/mL sobre as cepas ERV. Todas as associações mostraram-se sinérgicas, exceto a carbenicilina associado ao EHHS frente à LFBM EF 222, LFBM EF 280 e ATCC 51291. Esse estudo mostrou que a associação do EHHS com os antimicrobianos é majoritariamente sinérgica inibindo as cepas dos *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina; *Hymenaea stigonocarpa*, associação

ABSTRACT

Enterococcus faecalis are present in the gastrointestinal tract of mammals and cause serious nosocomial infections such as endocarditis and septicemia. The emergence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) strains is a serious public health problem, since antibiotic therapy is ineffective and restricted to a few drugs. Treatment is based to administration of tigecycline, daptomycin, carbenicillin, and streptomycin. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of the Hydroalcoholic Extract of *Hymenaea stigonocarpa* (EHHS) and four antimicrobials (carbenicillin, streptomycin, tigecycline and vancomycin) to which the eight strains of *Enterococcus faecalis* were resistant (LFBM EF 222, LFBM EF 271, LFBM EF 280, LFBM EF 288, LFBM EF 354, LFBM EF 421, LFBM EF 918, and ATCC 51291). The EHHS Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was 512µg/mL on the VRE strains. All associations were synergistic, except carbenicillin associated with EHHS against LFBM EF 222, LFBM EF 280 and ATCC 51291. This study showed that the association of EHHS with antimicrobials is mostly synergistic, inhibiting strains of *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin.

Keywords: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*; *Hymenaea stigonocarpa*, combination

LISTA DE ABREVIATURAS

APS: Ampicilina/Sulbactam;

ATS: Ágar Triptona de Soja;

CAR: Carbenicilina;

CTS: Caldo Triptona de Soja;

CIP: Ciprofloxacino;

CIM: Concentração Inibitória Mínima;

DZI: Diâmetro da Zona de Inibição;

ERV: *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina;

ERI: Eritromicina;

EHHS: Extrato Hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa*;

EST: Estreptomicina;

GEN: Gentamicina;

IC: Inibição Completa;

IMP: Imipenem;

LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica dos Microrganismos;

ML: Mililitros;

MER: Meropenem;

OMS: Organização Mundial da Saúde;

PEN: Penicilina;

TEC: Teicoplanina;

TET: Tetraciclina;

TIG: Tigeciclina;

UFC: Unidades Formadoras de Colônias;

VAN: Vancomicina.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Colônias de *Enterococcus faecalis* em meio Triptona Soja (TSB)

Figura 2: Cepas de *Enterococcus faecalis* em meio Triptona Soja (TSB);

Figura 3: Representação do Método *Overlay Inoculum Susceptibility Disc*;

Figura 4: *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá-do-cerrado);

Figura 5: Solução padronizada do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne;

Figura 6: Esterilização por filtração da solução padronizada de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex;

Figura 7: Padronização do inóculo das cepas de *Enterococcus faecalis* e representação do método *Overlay Inoculum Susceptibility Disc* para determinação do efeito antimicrobiano entre o extrato hidroalcoólico e antimicrobianos;

Figura 8: À esquerda (A) demonstra o controle e à direita demonstra o teste dos antimicrobianos frente ao extrato hidroalcoólico introduzido ao meio. Vancomicina (1); Tigeciclina (2); Carbenicilina (3) e Estreptomicina (4) com as cepas LFBM EF 222; LFBM EF 271; LFBM EF 280, respectivamente;

Figura 9: À esquerda (A) demonstra o controle e à direita demonstra o teste dos antimicrobianos frente ao extrato hidroalcoólico introduzido ao meio. Vancomicina (1); Tigeciclina (2); Carbenicilina (3) e Estreptomicina (4) com as cepas LFBM EF 288; LFBM EF 354; LFBM EF 421, respectivamente;

Figura 10: À esquerda (A) demonstra o controle e à direita demonstra o teste dos antimicrobianos frente ao extrato hidroalcoólico introduzido ao meio. Vancomicina (1); Tigeciclina (2); Carbenicilina (3) e Estreptomicina (4) com as cepas LFBM EF 918 e LFBM ATCC 51291, respectivamente;

Figura 11: Gráficos comparativos dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento das cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina (VRE) LFBM EF 222, LFBM EF 271, LFBM EF 280, LFBM EF 288, LFBM EF 354, LFBM EF 421, LFBM EF 918, e ATCC 51291. **Controle:** antimicrobianos: Carbenicilina, Estreptomicina,

Tigeciclina e Vancomicina; **Teste:** Associação do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* frente aos mesmos antimicrobianos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Origem do isolamento e fenótipo de resistência das oito cepas de *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes;

Tabela 2: Associação entre o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* e antimicrobianos frente a cepas de *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes utilizando o método *Overlay Inoculum Susceptibility Disc*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1. Gênero <i>Enterococcus</i>	16
3.1.1. Aspectos gerais	16
3.1.2. Metabolismo, características bioquímicas e morfológicas	16
3.1.3. Mecanismos de resistência	18
3.2. Método para o estudo de associações de antimicrobianos - <i>Overlay Inoculum Susceptibility Disc</i>	20
3.2.1 <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. Ex Hayne	20
3.3. Tratamentos	22
3.3.1 Carbenicilina	22
3.3.2 Estreptomicina	22
3.3.3 Tigeciclina	23
3.3.4 Vancomicina	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Microrganismos e preparação do inóculo.....	24
4.2 Material Vegetal.....	25
4.3 Preparação do extrato de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart. Ex Hayne	25
4.4 Preparação da solução do Extrato Hidroalcólico	25
4.5 Discos de antimicrobianos.....	26
4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	26
4.7 Associação do extrato hidroalcólico de <i>Hymenaea stigonocarpa</i> com discos de antimicrobianos.....	27
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* engloba os cocos Gram positivos classificados como do grupo D de Lancefield. Os enterococos são encontrados na microbiota de animais e seres humanos, residindo naturalmente no trato gastrointestinal e trato biliar e, encontrado em menor número na uretra masculina e na vagina. São bactérias que constituem importantes agentes etiológicos de infecções crônicas. Esse gênero forma colônias pequenas de aspecto liso e cinzento, com espécies que não são hemolíticas ou são alfa hemolíticas quando em crescimento em ágar sangue (PROCOP et al., 2018).

Os enterococos possuem resistência intrínseca a alguns agentes antimicrobianos dos quais outros membro da família *Streptococcaceae* são normalmente sensíveis. Esses microrganismos, ocupam o terceiro lugar do patógeno mais isolado em infecções nosocomiais e responsável pela segunda causa mais comum de bacteremias adquiridas em unidades de terapia intensiva (KHAN et al., 2022). Esse patógenos apresentam resistência *in vitro* a penicilina cuja Concentração Inibitória Mínima (CIM) é de 10 a 100 vezes maior que para outros membros dessa família, são resistentes ainda à maioria das cefalosporinas e aminoglicosídeos.

O gênero *Enterococcus* tem resistência adquirida à vancomicina devido ao uso indiscriminado. Essa resistência provavelmente foi devida ao consumo do antibiótico glicopeptídeo, avoparcina, em gado bovino a fim de promover o crescimento dos animais e, nos Estados Unidos, por consequência do aumento da administração de vancomicina em ambientes hospitalares. A espécie *Enterococcus faecalis* corresponde em média a 90% das infecções causadas em humanos (ORABABA et al., 2021). A colonização por *Enterococcus* resistente à vancomicina (ERV) é preocupante. Os pacientes com maior risco são aqueles com comorbidades ou imunossupressão incluindo aqueles com longa internação hospitalar, administração prolongada de antibióticos e contaminação com os colonizados por *Enterococcus* resistente à vancomicina (ERV) (LEVITUS et al., 2022).

Os enterococos apresentam resistência bacteriana a diversos antimicrobianos, a saber, tigeciclina a qual em alta eficácia pois bloqueia a síntese de proteínas bacterianas no estágio de alongamento (DADASHI et al., 2021). Ademais, cepas resistentes aos aminoglicosídeos possuem resistência cruzada a estreptomicina, tornando o tratamento

clínico difícil (SILVA et al., 2005). A carbenicilina, por sua vez, faz parte dos β -lactâmico e obtém sucesso clínico devido aos seus inibidores da transpeptidase que se ligam de forma cruzada à estrutura dos peptidoglicanos da parede celular bacteriana (RIVERA et al., 2021).

Hymenaea stigonocarpa Mart ex. Hayne, conhecida popularmente como jatobá-do-cerrado, é uma árvore típica no Cerrado, que devido ao uso extrativista possui uma grande importância econômica (GONÇALVES; CHAVES; DE CAMPOS TELLES, 2019). A casca do caule e polpa do fruto dessa espécie se tornou habitualmente utilizada na medicina natural, para tratamento de infecções gastrointestinais e inflamações (ORSI; SEITO; DI STASI, 2014). Os metabólitos secundários reconhecidos cientificamente nas cascas do caule da *Hymenaea stigonocarpa* Mart ex. Hayne, são os flavanóides, taninos, ácidos graxos, sesquiterpenos e terpenos, os quais possuem atividade antimicrobiana principalmente contra as bactérias Gram-positivas (DIMECH et al., 2013).

Diante do exposto acima, esse trabalho em teve por objetivo avaliar a atividade microbiana do extrato hidroalcoólico da *Hymenaea stigonocarpa* Mart ex. Hayne associado a quatro antimicrobianos, (carbenicilina, estreptomicina, tigeciclina e vancomicina) sobre a oito cepas *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* e de suas associações com antimicrobianos frente a cepas de *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hidro alcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* frente a dez cepas de *Enterococcus faecalis*;
- ✓ Associar o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* em concentração subinibitória (0,5CIM) a discos de carbenicilina, estreptomicina, tigeciclina e vancomicina sobre oito cepas de *Enterococcus faecalis*;
- ✓ Determinar o tipo de interação causada pelas associações sobre as oito cepas de *Enterococcus faecalis*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Gênero *Enterococcus*

3.1.1. Aspectos gerais

Descritas pela primeira vez em 1899, pelo pesquisador Thiercelin, na França, essas bactérias foram caracterizadas como um grupo de cocos Gram positivos, saprófitos e de origem intestinal (THIERCELIN & JOUHAUD, 1899).

Os enterococos, até meados da década de 80, foram considerados do gênero *Streptococcus* pertencentes ao grupo D de Lancefield, em razão das suas semelhanças morfológicas e bioquímicas (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019). Essas bactérias são onipresentes na natureza, fazem parte do trato gastrintestinal, da vagina e da cavidade oral dos seres humanos (LI; WALKER; DE OLIVEIRA, 2022), mas também são encontrados na água, solo, alimentos e no trato gastrintestinal de outros mamíferos, répteis, aves e insetos (MAKAROV et al., 2022).

3.1.2. Metabolismo, características bioquímicas e morfológicas

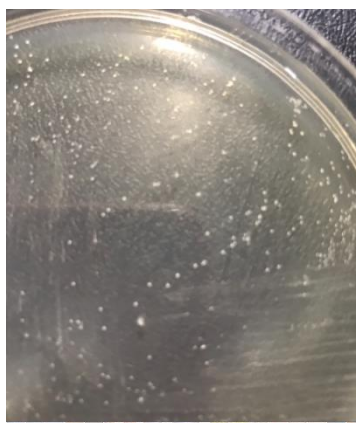
Enterococcus faecalis são morfolologicamente definidas como cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, catalase-negativos. Conseguem formar biofilme e fermentar carboidratos como, por exemplo, a glicose, produzindo ácido láctico. Toleram temperaturas que variam de 10 °C a 45 °C, suportando por 30 minutos temperaturas a 60 °C. Essa espécie possui baixa sensibilidade ao etanol, peróxido de hidrogênio, acidez, alcalinidade, ao dodecil sulfato de sódio e a altas concentrações de NaCl (PRADA et al., 2019).

Como agentes oportunistas, os enterococos possuem fatores de virulência, alguns com importância no desenvolvimento da infecção, como: a produção de enzimas líticas, (gelatinase e hialuronidase), ácido lipoteicóico, produção extracelular de superóxido e adesinas de superfície (PARADELLA et al., 2007). Estudos recentes comprovam que alguns desses fatores de virulência são presentes em plasmídeos, permitindo sua rápida propagação (GÖK et al., 2020). Sua alta resistência às variações de temperaturas e pH possibilitam aos enterococos a capacidade de resistir a procedimentos como

pasteurização e proliferar, por exemplo, no leite mesmo refrigerado (GOŁAŚ-PRĄDZYŃSKA; ŁUSZCZYŃSKA; ROLA, 2022).

Com relação às espécies de *Enterococcus*, a *E. faecalis* é responsável por cerca de 85 a 90% de todas as infecções enterocócicas nos seres humanos. Essas infecções incluem infecções endodônticas, endocardite, bacteremia, infecção urinária e infecções em feridas pós-operatórias (D'ANDREA et al., 2020).

Figura 1: Colônias de *Enterococcus faecalis* em meio Triptona Soja (TSB)



Fonte: O autor

Figura 2: Cepas de *Enterococcus faecalis* em meio Triptona Soja (TSB)



Fonte: O autor

3.1.3. Mecanismos de resistência

Um dos assuntos mais discutidos na atualidade, em saúde pública, está relacionado à administração indiscriminada de antimicrobianos. Segundo relatórios das Organizações das Nações Unidas (ONU), em 2050 as bactérias super-resistentes serão responsáveis pela morte de mais de 10 milhões de pessoas devido à falta de antimicrobianos eficazes. Os micro-organismos podem resistir devido a uma mutação genética e também podem evoluir através da seleção natural, pois o mal uso desses medicamentos podem eliminar as bactérias sensíveis aos fármacos, permanecendo apenas as mais resistentes. As mudanças genéticas podem acontecer por meio de mutações genéticas aleatórias, como explicado anteriormente, também pela aquisição do material genético de outros micro-organismos ou mesmo por recombinação de DNA. As cepas do gênero *Enterococcus* são capacitadas para realizar a transferência horizontal de genes (THG), específicos de resistência aos antibióticos (Paulsen IT. et al 2003; Kristich CJ. et al 2014; Huan Gu. et al., 2020).

Em 1989, foi encontrada nos Estados Unidos, a primeira cepa clínica de *Enterococcus faecalis* vancomicina resistente (Sahm et al, 1989; He, Q., Hou, Q., Wang, Y. et al., 2018) e atualmente esse coco Gram positivo juntamente com *Staphylococcus aureus* são os principais agentes etiológicos das doenças nosocomiais (Taskeen Raza. et al, 2018).

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo sintetizado em 1958 a fim de ser utilizado em tratamentos de infecções bacterianas causadas por bactérias Gram-positivas. Esse antibiótico atua impedindo a ligação dos pentapeptídeos a N-acetil glucosamina. Os enterococos resistentes a vancomicina adquire genes através dos plasmídeos ou transposon que inibem a ação desse antimicrobiano através de mutações e consequente seleção natural durante o uso do antibiótico (Marcone GL. et al., 2013; Hawkes N. et al., 2017; Taskeen Raza. et al, 2018).

Existe um grande desafio no tratamento de doenças causadas por enterococos resistente à vancomicina (ERV) devido a sua capacidade em desenvolver resistência cruzada a outros antibióticos (Reinseth IS. Et al. 2019; Oluwatosin Qawiyy Orababa. et al, 2021). Pesquisas sobre modificações estruturais da vancomicina foram realizadas a fim de obter análogos mais eficaz sobre os ERVs. (Hawkes N. et al, 2017).

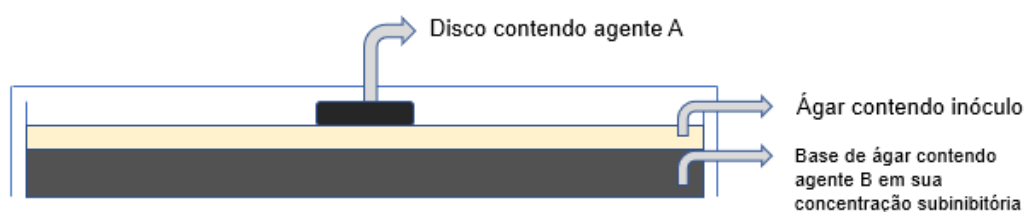
O tratamento contra a *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina é realizado com daptomicina (DAP), uma droga lipopeptídica (Miller WR. et al, 2016; William R. Miller. Et al, 2020). A DAP tem mecanismo de ação nas funções da membrana celular, inibindo a síntese de proteínas (RNA e DNA) e a homeostase do envelope celular devido as interações com os fosfolipídios, causando ao final lise da membrana e morte bacteriana (HEIDARY et al., 2017). Em *E. faecalis* resistentes, ocorre uma redistribuição dos fosfolipídios da membrana para longe de onde ocorre a divisão celular, fazendo assim um desvio que protege toda a estrutura do septo, evitando a lise celular. (Tran TT. et al., 2013; William R. Miller. et al., 2020).

Os lipoglicopeptídeos também são um grande substituinte por ser construído de forma semelhante à vancomicina, por um núcleo de glicopeptídeo, mas nos mesmos têm um acréscimo hidrofóbico que tem a funcionalidade de respaldar a molécula do antibiótico nas células. Embora diversos estudos estejam sendo validados e assegurados de uma melhor efetividade, faz-se necessário uma melhor instrução para toda a população acerca do uso indiscriminado de antibióticos. Ademais, uma higienização adequada dos hospitais com o objetivo de diminuir a taxa de infecções hospitalares também é necessário (William R. Miller. et al., 2020).

3.2. Método para o estudo de associações de antimicrobianos-*Overlay Inoculum Susceptibility Disc*

Para avaliar a associação e interação com antimicrobianos, o Método de *Overlay Inoculum Susceptibility Disc* corresponde a um teste realizado em meio sólido, onde um dos antimicrobianos é incorporado no meio com concentração e microrganismo teste definidos previamente, aplicando discos de antibióticos com a finalidade de obter uma sobreposição dos mesmos. Para realizar um controle desse método, é necessário realizar o procedimento com placas com o meio de cultura sem o antimicrobiano. Entende-se como sinergismo quando há uma determinação nas correlações entre o diâmetro da zona de inibição do halo na placa de Petri e os índices de concentração inibitória, então, um aumento de 19% ou mais, corresponde ao efeito sinérgico. Além disso, quando as correlações são inferiores a 19% de aumento do diâmetro da zona de inibição, corresponde ao efeito aditivo (CHINWUBA et al., 1991). E quando as correlações são iguais 19% do diâmetro da zona de inibição, corresponde ao efeito indiferente (LAISHRAM et al, 2017).

Figura 3: Representação do Método *Overlay Inoculum Susceptibility Disc*



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

3.2.1 *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne

Popularmente conhecida como jatobá-do-cerrado, a espécie *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne pertence à família Fabaceae. Trata-se de uma planta arbórea, caducifólia, inerme, monóica e com altura de até 15m. Além disso, sua casca externamente é espessa, de superfície cinzenta a pardacentas, e internamente vermelha, tendo efeito gastro-protetor, cicatrizante e antidiarreico (FARIAS et al., 2017). O tronco varia o tamanho, podendo ser encontradas alongados ou curtos, sua madeira é pesada com cerne marrom, folhas alternas bifolioladas, glabras ou pilosas e suas flores nas maiorias das espécies possuem inflorescências paniculadas curtas, robustas e brancas (SOUZA et al., 2021). O fruto dessa espécie pode ser seco, indeiscente, assimétrico, achatado ou roliço, sendo apiculado ou não.

Figura 4: *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá-do-cerrado)



(Fonte: CARVALHO, 2006.)

Hymenaea stigonocarpa encontra-se em diversos países, como Brasil, Bolívia (KILLEEN et al., 1993), Paraguai e Venezuela (CARVALHO, 2007). Representada principalmente no Brasil, país onde tem a maior variedade da espécie *H. stigonocarpa*. Ocorre nos estados de Bahia (SANTOS et al., 2002), Ceará (COSTA et al., 2004), Maranhão (CONCEIÇÃO et al., 1997), Minas Gerais (GOMIDE, 2004), Pará, Pernambuco, Piauí (CASTRO, 1994), São Paulo (DURIGAN et al., 2004), Tocantins e

e outros estados da região Centro-Oeste, habitando cerrados e cerradões de solos argilosos, arenosos e também litólicos.

A madeira da *H. stigonocarpa* é utilizada para confecções diversos utensílios no meio rural, como, por exemplo, móveis, cercas, edificações e artefatos. Sua seiva avermelhada é utilizada para produção de xarope, visto que tem propriedade fortificante e afrodisíaca. Bastante utilizada na fitoterapia, para afecções pulmonares, como cicatrizantes, problemas renais, vermífugo, bronquite, cistite crônica e dor de garganta (BONIFACE; BAPTISTA FERREIRA; ROLAND KAISER, 2017). Sua tintura avermelhada também é utilizada no tingimento de fios de algodão artesanal.

Na casca do tronco de *Hymenaea* estão presentes inúmeros compostos orgânicos, por exemplo, ácidos graxos, flavonoides, esteroides, cumarinas, terpenóides e procianidinas. O extrato da casca é efetivo devido a diversos estudos dentro da literatura que revelam as atividades antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatório, antioxidante, antiplasmodial, antiúlcera, antiviral, hepatoprotetora, miorrelaxante e antiproliferativo (BONIFACE; BAPTISTA FERREIRA; ROLAND KAISER, 2017).

3.3. Tratamento

3.3.1 Carbenicilina

Carbenicilina foi primeira penicilina utilizada contra as pseudomonas, aprovada na década de 1970 tornou-se um avanço no tratamento dessas bactérias (ENDRES; TOLTZIS, 2021). É um antibiótico para o qual, os *Enterococcus faecalis* têm uma sensibilidade (TORRES et al., 2018). A estrutura básica desse grupo, possui um anel tiazolidínico juntamente a um anel beta-lactâmico, ligam-se as proteínas das bactérias inibindo a síntese da parede celular proporcionando lise celular (“Penicillins (4th Generation)”, 2012). Os enterococos desenvolveram resistências bacterianas às penicilinas devido a uma enzima capaz de destruir o anel beta-lactâmico, resultando na inatividade (WRIGHT, 1999).

3.3.2 Estreptomicina

A estreptomicina foi o primeiro antimicrobiano aminoglicosídeo descoberto. Originalmente isolado a partir da cultura da bactéria *Streptomyces griseus* (WEBSTER;

SHEPHERD, 2022) foi utilizado para tratamento da tuberculose, mas tornou-se amplamente utilizado no tratamento de diversas infecções bacterianas, incluindo casos de endocardite (WATERS; TADI, 2020). Seu mecanismo de ação consiste no bloqueio a tradução das proteínas que ocorre na subunidade ribossômica 30 S das bactérias. Essa interação causa danos que inibem a leitura correta de códons, impossibilitam o alongamento dificultando a síntese de proteínas e revisão da tradução, causando danos celular generalizado e estresse oxidativo (ROCHA et al., 2021).

3.3.3 Tigeciclina

A tigeciclina é um antimicrobiano semissintético da classe única da glicilciclina eficaz para o tratamento de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos às infecções microbianas nosocomiais multirresistentes (YAGHOUBI et al., 2021). A tigeciclina tem atividade antimicrobiana contra 99,5% das VRE (KHAN et al., 2022). Esse antimicrobiano é utilizado em últimos casos para tratar infecções graves e é uma droga bacteriostática, atua na subunidade ribossomal 30 S, inibindo a tradução das proteínas (AMANN et al., 2022). A tigeciclina resulta no bloqueio do crescimento bacteriano e na perda da formação peptídica, isso se deve ao fato da ligação desse antimicrobiano impedir o agrupamento dos resíduos de aminoácidos pelo alongamento da cadeia peptídica (KAEWPOOWAT; OSTROSKY-ZEICHNER, 2014). Atuando no ribossomo bacteriano, esse antibiótico quando ingerido divide-se ligeiramente pela generalidade dos tecidos causando um baixo nível de concentrações séricas do antimicrobiano (CHIOTOS et al., 2020). Como a maioria dos ERV são resistentes aos aminoglicosídeos, uma das opções terapêuticas é a tigeciclina utilizada para o tratamento das infecções dessa bactéria multirresistente (BENDER et al., 2018).

3.3.4 Vancomicina

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídeo, utilizado para tratamentos das bactérias Gram-positivas multirresistentes aos pacientes de infecções severas, com isso diversos estudos estão sendo realizados para desenvolver estratégias de prevenção, aprimoramento e restabelecimento na utilização da vancomicina (JOSHI; SHALLAL; ZERVOS, 2021). Dentre os mecanismos de resistência à vancomicina, os alvos

específicos projetados para esse antibiótico interferir são: permeabilidade da membrana, função do DNA da bactéria, síntese da parede celular, síntese do ácido fólico e na síntese de proteínas bacterianas, sendo a síntese da parede celular o objetivo da vancomicina em bactérias gram-positivas (MÜHLBERG et al., 2020). Seu mecanismo de ação está ligado a inibição da polimerização do peptidoglicano na parede celular, causando efeitos deletérios e consequentemente um extravasamento dos constituintes intracelulares, promovendo a lise celular (SHIVALI et al., 2019). A farmacocinética desse antimicrobiano é bastante complexa, a droga é aplicada intravenosamente, com ciclo de infusão de pelo menos 1 hora com a finalidade de diminuir os efeitos adversos (RYBAK, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e preparação do inóculo

Oito cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina foram obtidas de culturas-estoques mantidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos–Departamento de Antibióticos-UFPE. Esses microrganismos foram cultivados em caldo Agar Triptona de Soja (TSA), incubados por 24 horas a 37° C.

A origem do isolamento das cepas e seus respectivos fenótipos de resistência para antibióticos comumente utilizados para o tratamento de infecções bacterianas estão apresentados na tabela 1.

As culturas foram diluídas em solução salina esterilizada a fim de obter um inóculo de 10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL comparável ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland.

Tabela 1: Origem do isolamento e fenótipo de resistência das oito cepas de *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes

Cepas de <i>Enterococcus faecalis</i>	Origem	Perfil de resistência
LFBM 280	HEMOCULTURA	IMP,CIP,PEN,ERI,VAN
LFBM 918	HEMOCULTURA	MER,EST,GET,VAN

LFBM 421	HEMOCULTURA	IMP,TEC,CIP,APS,PEN,ERI,VAN,TET
LFBM 354	HEMOCULTURA	IMP,TEC,CIP,APS,PEN,ERI,VAN,TET
LFBM 272	HEMOCULTURA	IMP,TEC,CIP,APS,PEN,ERI,VAN
LFBM 222	HEMOCULTURA	IMP,TEC,CIP,APS,PEN,ERI,VAN,TET
LFBM 288	HEMOCULTURA	IMP,TEC,CIP,APS,PEN,ERI,VAN,TET
ATCC 55291	FLUIDO PERITONEAL	VAN, TEC

Ampicilina/Sulbactam (APS), Ciprofloxacina (CIP), Eritromicina (ERI), Estreptomicina (EST), Gentamicina (GET), Imipidem (IMP), Meropenem (MER), Penicilina (PEN), Teicoplanina (TEC), Tetraciclina (TET), Vancomicina (VAN), Laboratório de Fisiologia e Bioquímica dos Microrganismos (LFBM) e ATCC (American Type Culture Collection).

4.2 Material Vegetal

Cascas do caule de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne foram coletados pelo Dr. Gustavo Dimech na cidade de Camocim de São Félix, Pernambuco, Brasil (Latitude: 8° 21' 34" Sul, Longitude: 35° 45' 50" Oeste). Uma exciscata da planta foi depositada no herbário Dardano de Andrade Lima-Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e registrada sob o n.º 53563.

4.3 Preparação do extrato de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne

As cascas do caule foram secas ao ar, moída em moinho de martelos (Tigre ASN5) e armazenada em frasco âmbar à temperatura ambiente. O extrato hidroalcoólico (HE) foi obtido por maceração de 60 g (1:2 p/v) em etanol/água (1:1) conforme metodologia descrita por Gustavo Dimech (DIMECH, 2013).

4.4 Preparação da solução do Extrato Hidroalcoólico

A partir dos cristais obtidos do extrato hidroalcoólico foi pesado 0,1024g em balança analítica (Quimis) e solubilizado no balão volumétrico com etanol: H₂O (1:1). Após isso, esterilizados sob filtração usando membrana de 60mm de diâmetro e 0,22µm

de porosidade (**Figura 5-6**). Essa solução padrão ($1024\mu\text{g/mL}$) foi diluída seriadamente para obter soluções que variaram de $512-32\mu\text{g/mL}$

Figura 5: Solução padronizada do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne



À esquerda, solução padronizada do EHHS e a direita solução esterilizada para uso.

(Fonte: Professora Eulália Ximenes)

Figura 6: Esterilização por filtração da solução padronizada de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex



(Fonte: Professora Eulália Ximenes)

4.5 Discos de antimicrobianos

Discos de antimicrobianos carbenicilina ($100\mu\text{g}$), estreptomicina ($300\mu\text{g}$), tigeciclina ($15\mu\text{g}$) e vancomicina ($30\mu\text{g}$) marca Oxoid foram utilizados neste estudo.

4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

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 do extrato de *H. stigonocarpa* foram preparadas para obter concentrações que variaram de 512 A 32 µg/mL (**Figura 7**). Ao final, 4,5 da suspensão bacteriana padronizada, foram dispensados em todos os tubos. Uma avaliação antimicrobiana do sistema etanol/H₂O (1:1) foi incluída neste estudo, para excluir a possibilidade de efeitos tóxicos sobre as cepas de enterococos. A solução foi esterilizada por filtração a vácuo utilizando uma membrana Milipore® de porosidade 0,22µm e 150µm de espessura. A CIM é considerada a menor concentração do extrato hidroalcolico capaz de inibir o crescimento bacteriano após 24 h de incubação a 37°C.

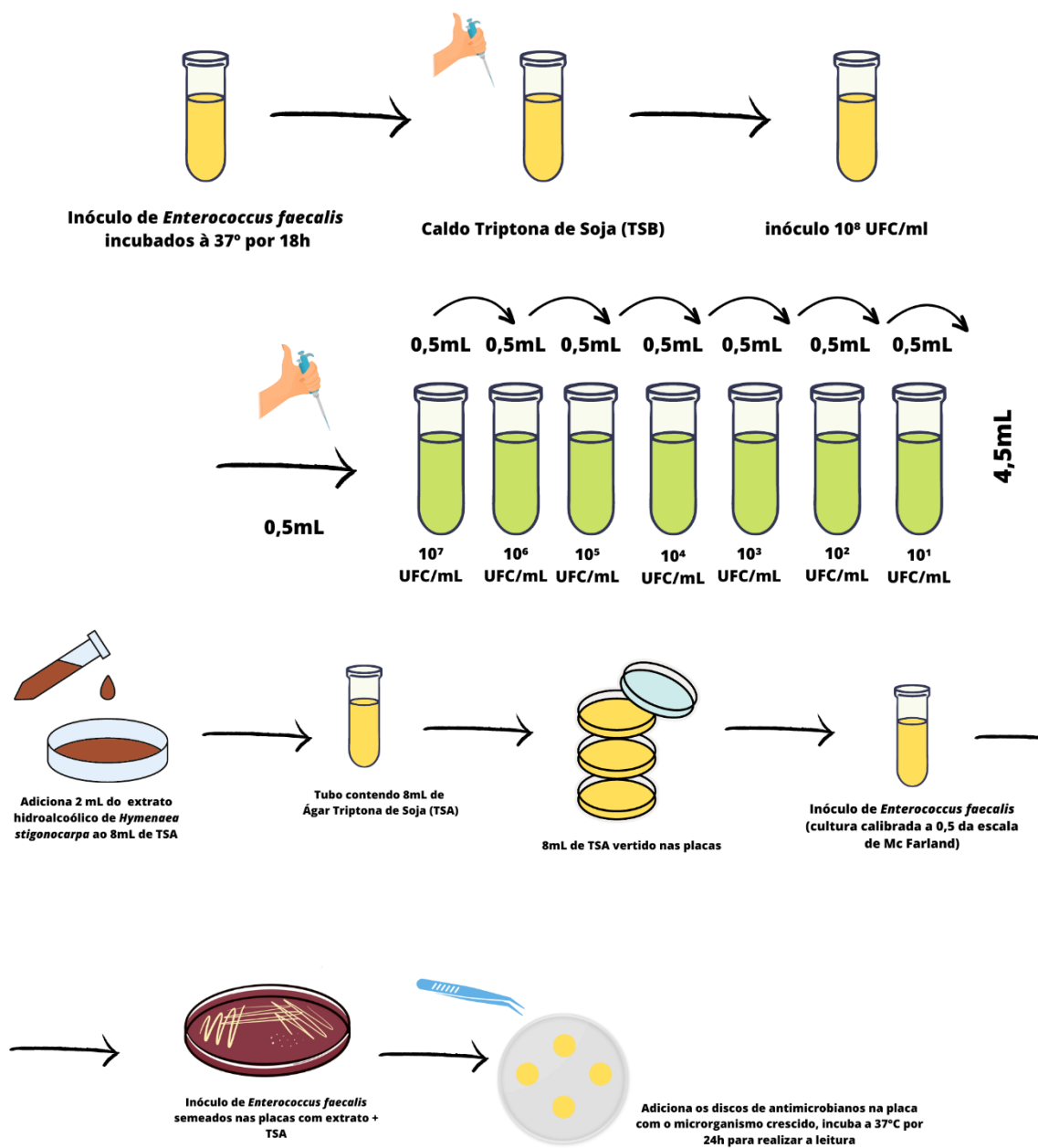
4.7 Associação do extrato hidroalcolico de *Hymenaea stigonocarpa* com discos de antimicrobianos

A avaliação das associações do EHHS com discos de antimicrobianos: carbenicilina (100µg), estreptomicina (300µg), tigeciclina (15µg) e vancomicina (30µg) foram realizadas pelo método *Overlay Inoculum Susceptibility Disc* (LAISHRAM et al., 2017).

Esse procedimento experimental é uma modificação do método de difusão em meio sólido. Uma solução padronizada do extrato hidroalcolico de *Hymenaea stigonocarpa* equivalente a 0,5 CIM foi incorporada ao ágar triptona de soja (ATS) e vertido nas placas. Posteriormente, sobre esse meio solidificado o microrganismo foi semeado com o swab estéril. As placas foram postas em superfície plana até a total solidificação. Em seguida, discos de carbenicilina, estreptomicina, tigeciclina e vancomicina foram dispostos sobre a superfície do meio de forma equidistante. As placas foram incubadas à 37 °C por 24 horas (Figura 7).

Após esse período as placas foram avaliadas e os diâmetros da zona de inibição em torno dos discos foram medidos. Um aumento no diâmetro da zona de inibição (DZI) em torno do disco de 19% corresponde a um efeito sinérgico, inferior ou igual 19% um efeito aditivo e nenhuma variação do DZI é indicativo de um resultado indiferente (LAISHRAM et al., 2017).

Figura 7: Padronização do inóculo das cepas de *Enterococcus faecalis* e representação do método Overlay Inoculum Susceptibility Disc para determinação do efeito antimicrobiano entre o extrato hidroalcoólico e antimicrobianos



(Fonte: O autor)

5. RESULTADOS

5.1. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* (EHHS)

O EHHS apresentou uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 512 µg/mL frente a todas as oito cepas de *Enterococcus faecalis* utilizadas neste estudo (LFBM EF 222, LFBM EF 271, LFBM EF 280, LFBM EF 288, LFBM EF 354, LFBM EF 421, LFBM EF 918 e ATCC 55291).

5.1.2 Associação *Hymenaea stigonocarpa*-antimicrobianos

A atividade da associação *Hymenaea stigonocarpa* e antimicrobianos frente as cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina (VRE) estão representadas na tabela 2.

Foram realizados 32 testes, dos quais 29 mostraram-se sinérgicos, devido ao aumento percentual de 19 % dos halos de inibição em relação aos seus controles (Figura 8, 9 e 10). Três cepas obtiveram inibição completa do crescimento bacteriano pela associação EHHS- antimicrobianos, sendo elas: LFBM EF 280 para a estreptomicina; LFBM EF 288 para a carbenicilina; ATCC 51291 para vancomicina e estreptomicina. Foi observado também, algumas associações com efeitos indiferentes EHHS-carbenicilina para a cepa ATCC 51291, a cepa LFBM EF 222 e LFBM EF 280 (Figura 8 e 10).

Tabela 2: Associação entre o extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* e antimicrobianos frente a cepas de *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes utilizando o método *Overlay Inoculum Susceptibility Disc*

<i>Enterococcus faecalis</i>	Associação entre antimicrobianos e EHHS	Efeito das associações
LFBM EF 222	Vancomicina (30µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Tigeciclina (15µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Carbenicilina (100µg) + EHHS	INDIFERENTE
	Estreptomicina (300µg) + EHHS	SINÉRGICO
LFBM EF 271	Vancomicina (30µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Tigeciclina (15µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Carbenicilina (100µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Estreptomicina (100µg) + EHHS	SINÉRGICO
LFBM EF 280	Vancomicina (30µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Tigeciclina (15µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Carbenicilina (100µg) + EHHS	INDIFERENTE
	Estreptomicina (300µg) + EHHS	SINÉRGICO
LFBM EF 288	Vancomicina (30µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Tigeciclina (15µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Carbenicilina (100µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Estreptomicina (300µg) + EHHS	SINÉRGICO
LFBM EF 354	Vancomicina (30µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Tigeciclina (15µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Carbenicilina (100µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Estreptomicina (300µg) + EHHS	SINÉRGICO
LFBM EF 421	Vancomicina (30µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Tigeciclina (15µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Carbenicilina (100µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Estreptomicina (300µg) + EHHS	SINÉRGICO
LFBM EF 918	Vancomicina (30µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Tigeciclina (15µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Carbenicilina (100µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Estreptomicina (300µg) + EHHS	SINÉRGICO
ATCC 51291	Vancomicina (30µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Tigeciclina (15µg) + EHHS	SINÉRGICO
	Carbenicilina (100µg) + EHHS	INDIFERENTE
	Estreptomicina (300µg) + EHHS	SINÉRGICO

ATCC: American Type Culture Collection; LFBM: Laboratório de Fisiologia e Bioquímica dos Micro-organismos; EHHS: Extrato Hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa*

(Fonte: O autor)

Figura 8: À esquerda (A) demonstra o controle e à direita demonstra o teste dos antimicrobianos frente ao extrato hidroalcoólico introduzido ao meio. Vancomicina (1); Tigeciclina (2); Carbenicilina (3) e Estreptomicina (4) com as cepas LFBM EF 222; LFBM EF 271; LFBM EF 280, respectivamente.

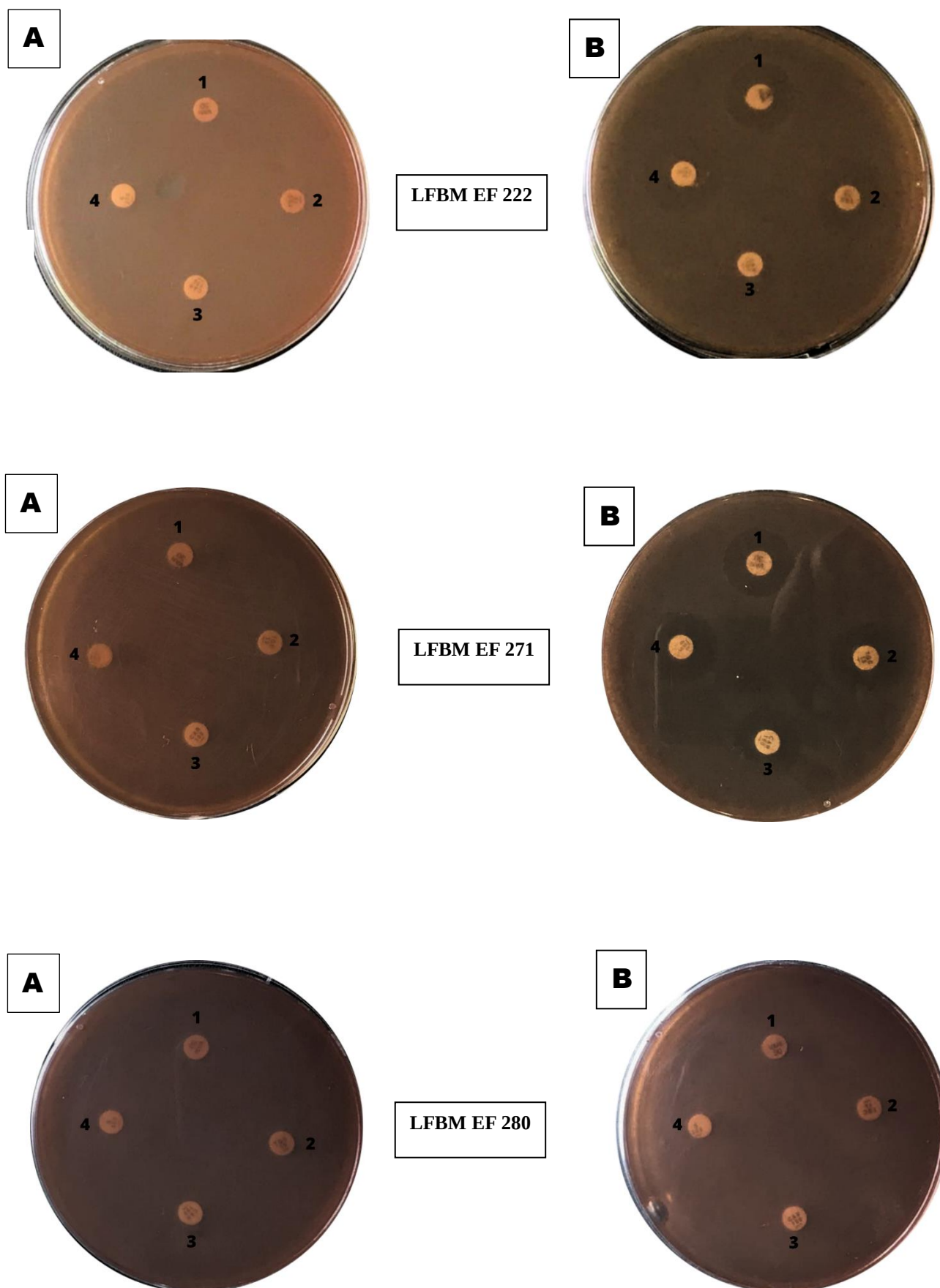


Figura 9: À esquerda (A) demonstra o controle e à direita demonstra o teste dos antimicrobianos frente ao extrato hidroalcoólico introduzido ao meio. Vancomicina (1); Tigeciclina (2); Carbenicilina (3) e Estreptomicina (4) com as cepas LFBM EF 288; LFBM EF 354; LFBM EF 421, respectivamente.

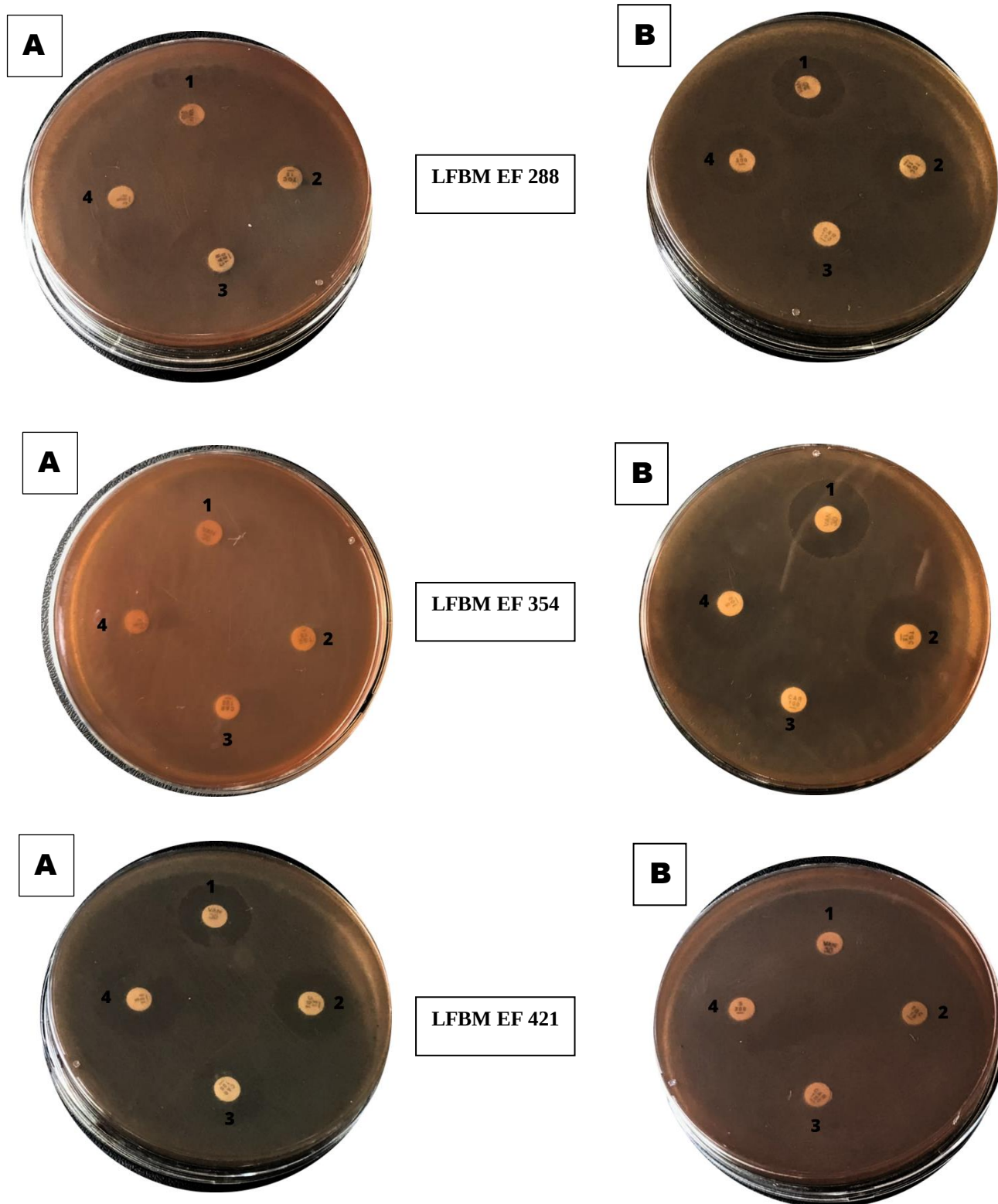
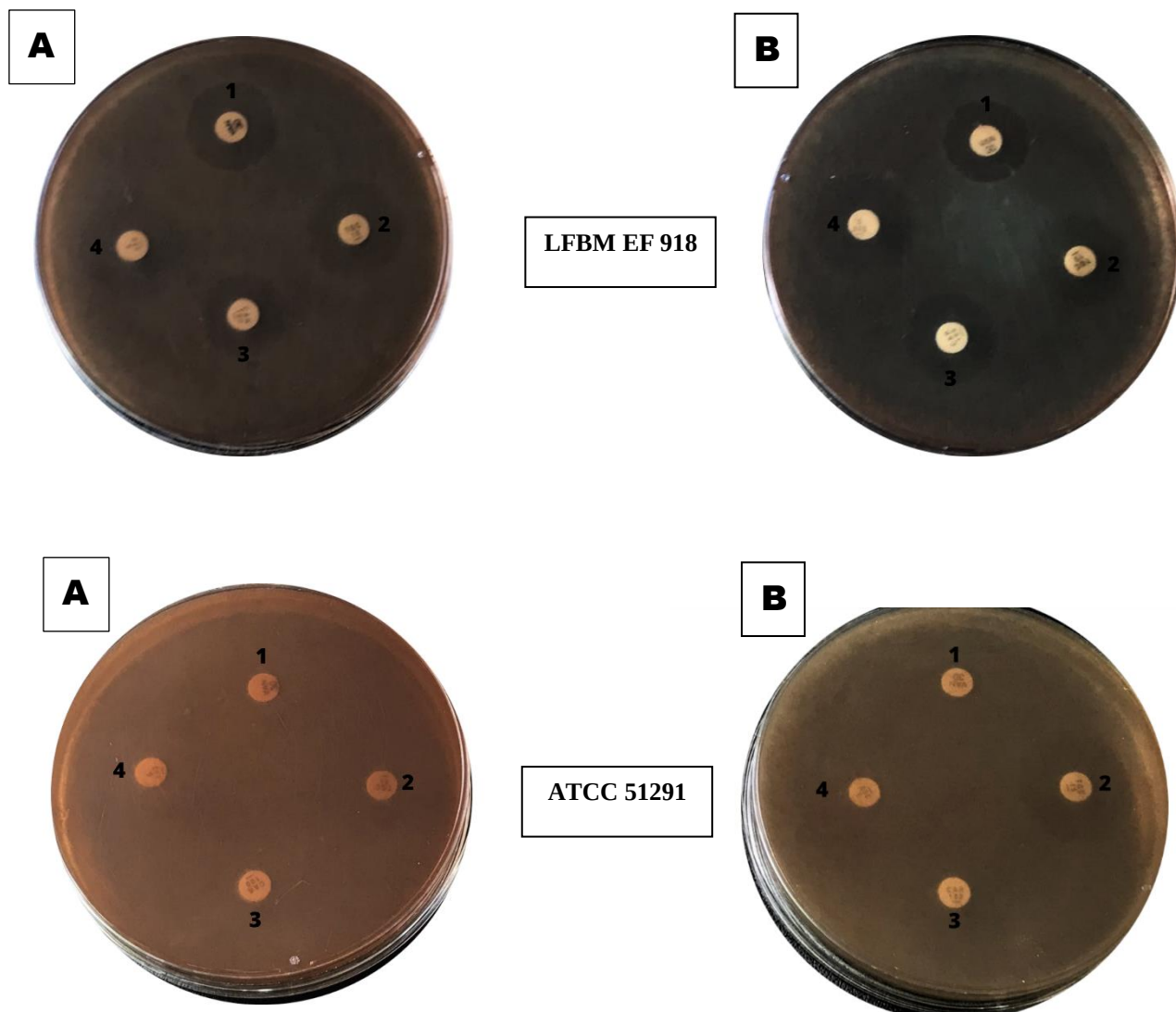
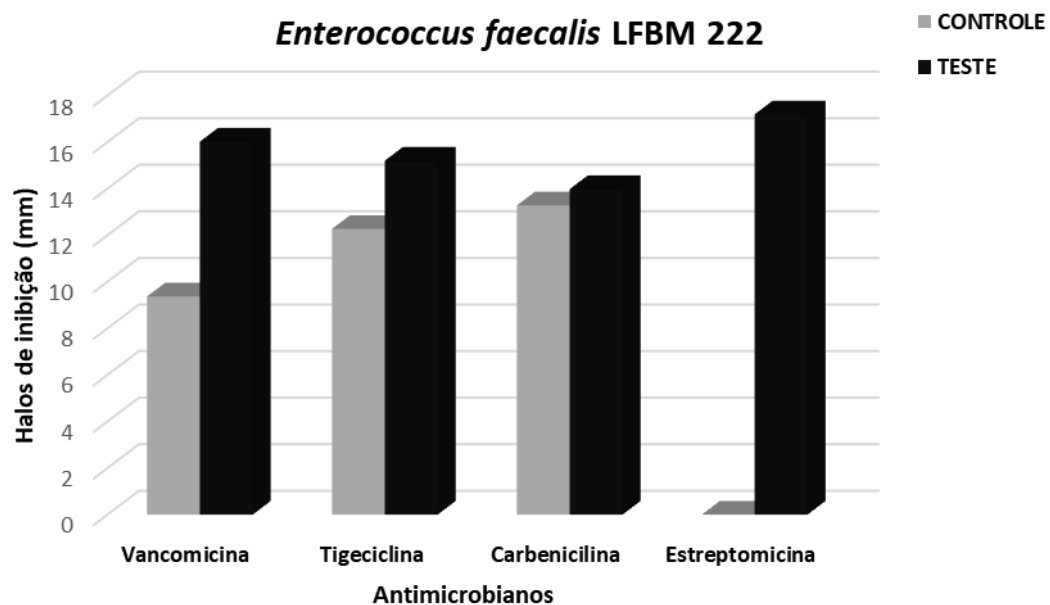


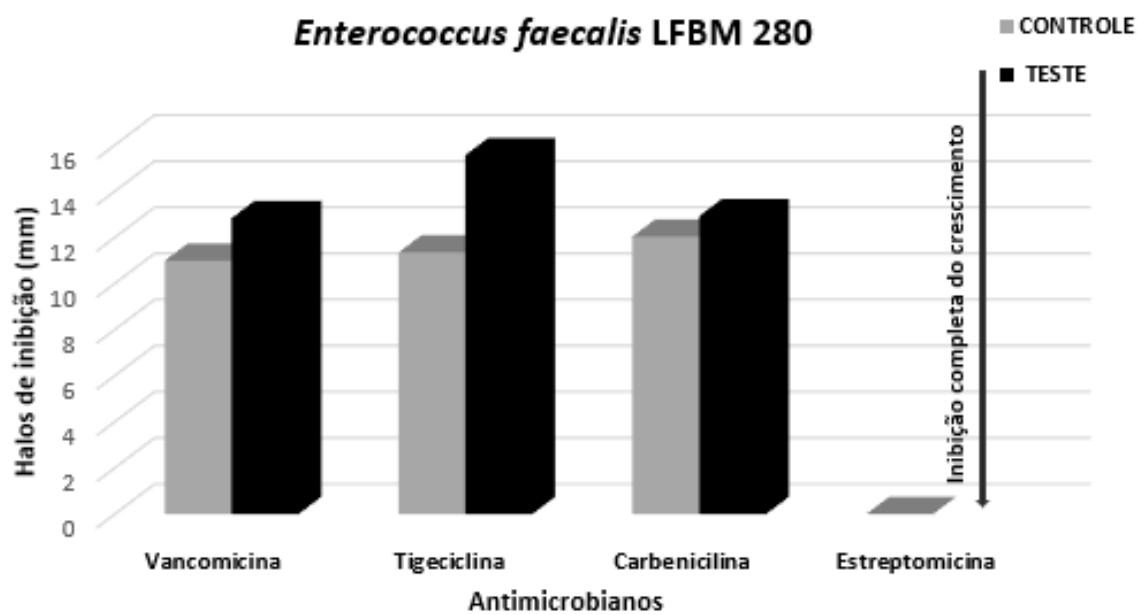
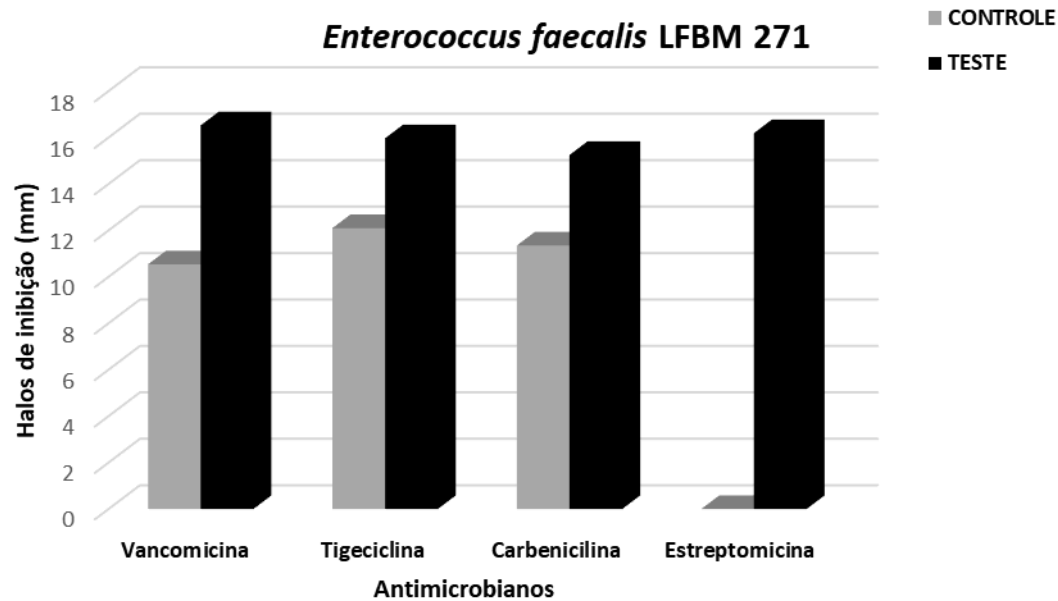
Figura 10: À esquerda (A) demonstra o controle e à direita demonstra o teste dos antimicrobianos frente ao extrato hidroalcoólico introduzido ao meio. Vancomicina (1); Tigeciclina (2); Carbenicilina (3) e Estreptomicina (4) com as cepas LFBM EF 918 e ATCC 51291, respectivamente.

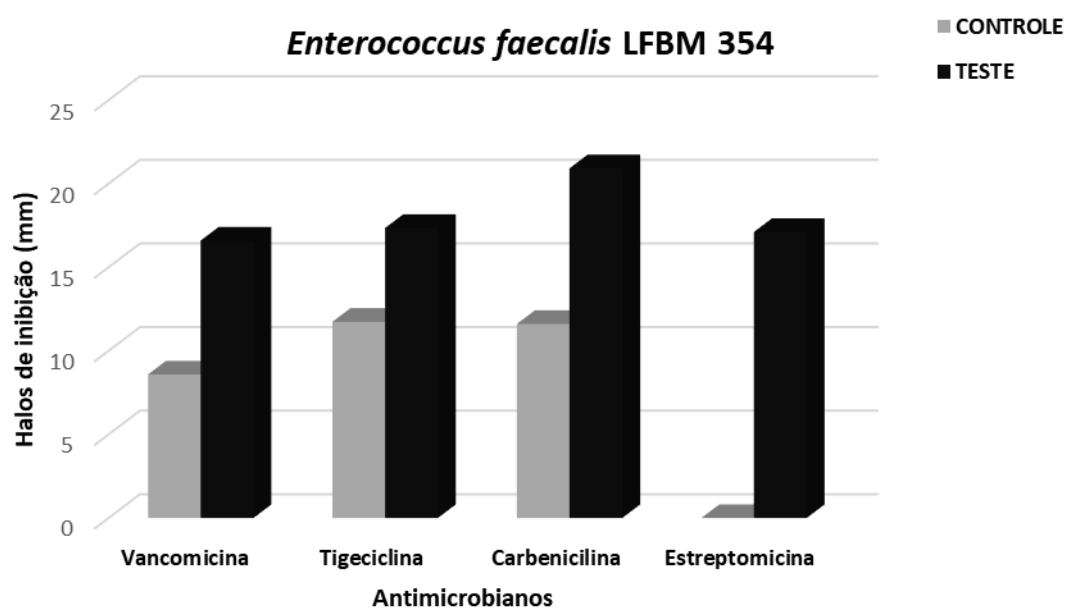
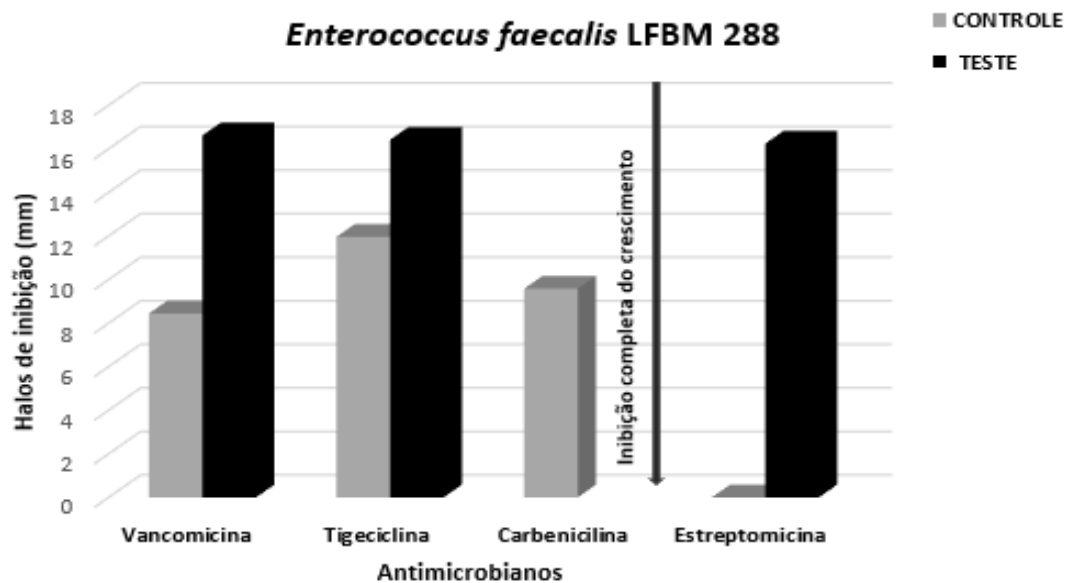


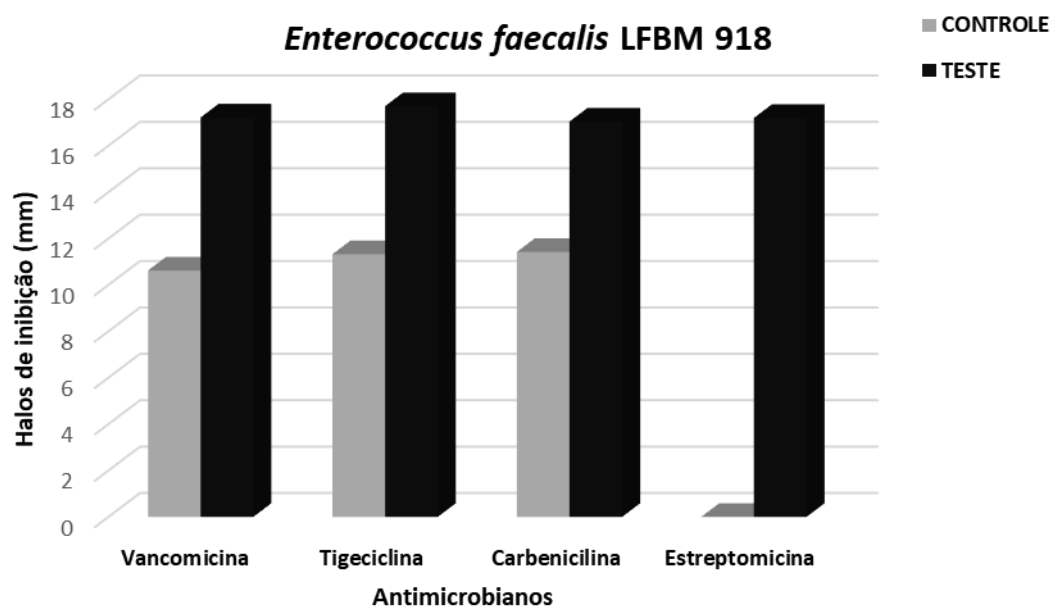
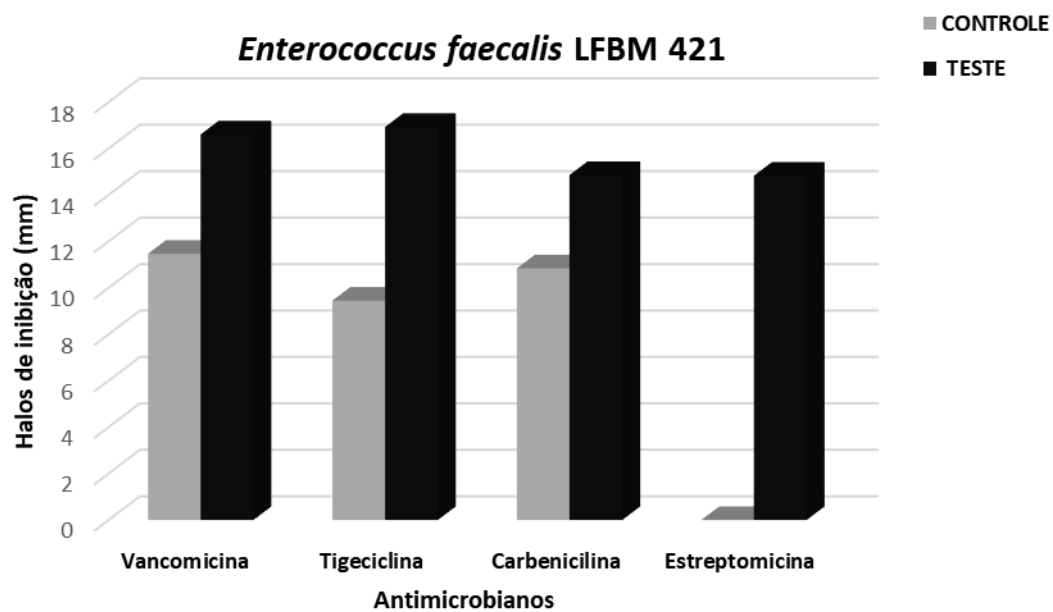
(Fonte: O autor)

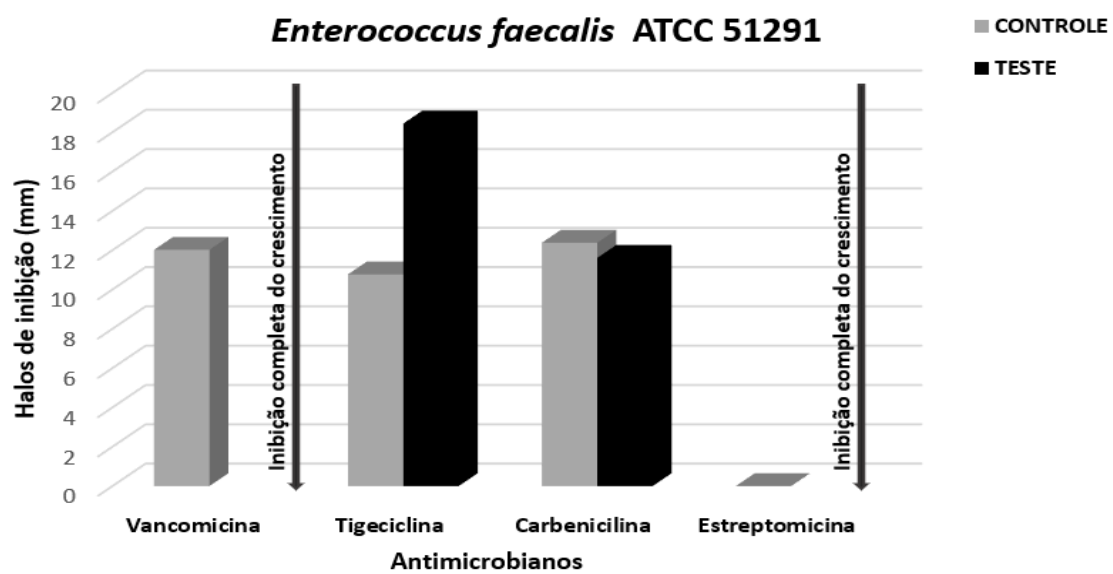
Figura 11: Gráficos comparativos dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento das cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina (VRE) LFBM EF 222, LFBM EF 271, LFBM EF 280, LFBM EF 288, LFBM EF 354, LFBM EF 421, LFBM EF 918, e ATCC 51291. **Controle:** antimicrobianos: Carbenicilina, Estreptomicina, Tigeciclina e Vancomicina; **Teste:** Associação do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* frente aos mesmos antimicrobianos.











(Fonte: O autor)

6. DISCUSSÃO

Enterococcus faecalis resistente à vancomicina (ERV) é considerada uma das principais ameaças à saúde pública (LIMA; ALMEIDA; OLIVEIRA, 2020). Essa bactéria provoca infecções nosocomiais graves e em pacientes comunitários infecções do trato urinário, canais radiculares, válvulas cardíacas (ALI; CHEUNG; NEELAKANTAN, 2022). Esse microrganismo possui diversos mecanismos de resistência e por essa razão torna-se necessário a busca por novas moléculas e opções terapêuticas, como por exemplo as associações de fármacos. Nesse sentido as plantas são uma fonte inesgotável de moléculas bioativas.

A falta de antibióticos para o tratamento dessas bactérias é extremamente sério e uma questão de saúde pública. Os pacientes acometidos pelas infecções por ERV apresentam grande dificuldade em encontrar algum fármaco eficaz e esses são caros.

Nesse estudo foi observado o potencial antimicrobiano do Extrato Hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* (EHHS) com a finalidade de inibir o crescimento das cepas do ERV. As cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina de modo geral tem um perfil de resistência para vários antimicrobianos inclusive os utilizados nesse estudo.

VILELA, e colaboradores, 2009 isolou a primeira vez ERV em Recife, Pernambuco, Brasil. Esse estudo mostrou frente a quatro isolados 100% de suscetibilidade a ampicilina. Entretanto essas cepas foram altamente resistentes aos aminoglicosídeos. Nossos resultados corroboram ao de Vilela pois, todas as cepas de enterococos foram resistentes a estreptomicina discos com 300µg, mas essa resistência desaparece quando em associação com EHHS numa concentração de 256µg/mL.

O EHHS é rico em flavanóides, flavonóis e flavonas (FESSENDEN, 1982), terpenóides (TORSSEL, 1989), polipeptídeos (TERRAS et al., 1993; ZHANG; LEWIS, 1997), cumarinas (O'KENNEDY & THORNES, 1997), substâncias fenólicas (STERN, et al., 1996) e taninos (SCALBERT, 1992).

Dimech 2013, determinou em seu estudo os metabólitos secundários presentes no extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* exercem alterações estruturais no citoplasma, septo e parede celular das bactérias que os taninos condensados e flavonoides presentes no EHHS foram os responsáveis pela morte das cepas de *Staphylococcus aureus*. O EHHS apresentou maior conteúdo de flavonoides. Podendo assim, corroborar com os resultados obtidos no trabalho presente frente as cepas *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina.

Da mesma forma Satyajeet Das 2019, realizou uma avaliação antimicrobiana da quercetina, um tipo de flavonoide, frente *Enterococcus faecalis*. A quercetina tem como principal mecanismo de ação, o bloqueio da atividade de diversas enzimas implicadas com o metabolismo microbiano, impedimento dessa forma o crescimento bacteriano.

Nesse estudo, obtivemos efeitos sinérgicos na maior parte das associações concluindo que o EHHS é realmente o protagonista da associação, uma vez que, os antimicrobianos mostraram uma atividade antimicrobiana medíocre.

Com relação aos efeitos indiferentes, aqueles em que não apresentaram alteração sobre a inibição dos ERV, poderão ser explicados, possivelmente por que as cepas são possuidoras de vários mecanismos de resistência à carbenicilina.

Fica evidente a importância de pesquisas acerca das associações de antimicrobianos, em especial moléculas de origem natural-antimicrobianos convencionais, A sinergia entre os mesmos é fato e promissor para futuras pesquisas sobre *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina.

7. CONCLUSÕES

As cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina (ERV) foram inibidas com o extrato hidroalcoólico da *Hymenaea stigonocarpa* (EHHS) numa concentração de 512µg/mL;

As cepas de *Enterococcus faecalis* mostraram-se resistentes a todos os antimicrobianos convencionais utilizado;

Das associações, EHHS-antimicrobiano, 90,63% apresentaram sinergismo.

Associações indiferentes do EHHS-antimicrobiano foram observadas sobre as três cepas de *Enterococcus faecalis* (LFBM EF 280, LFBM EF 288 e ATCC 51291) o que representa 9,38% de todas as associações avaliadas.

Esses resultados podem servir como base para futuras pesquisas acerca da utilização do extrato hidroalcoólico de *Hymenaea stigonocarpa* e antimicrobianos no tratamento das cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina.

8. REFERÊNCIAS

- ALI, I. A. A.; CHEUNG, G. S. P.; NEELAKANTAN, P. Transition Metals and *Enterococcus faecalis*: Homeostasis, Virulence and Perspectives. **Molecular Oral Microbiology**, v. 37, p. 276-291, 2022.
- AMANN, L. F. *et al.* Tigecycline Dosing Strategies in Critically Ill Liver-Impaired Patients. **Antibiotics**, v. 11, n. 4, p. 479, 2022.
- AYOBAMI, O. *et al.* The ongoing challenge of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Europe: an epidemiological analysis of bloodstream infections. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 1180–1193, 1 jan. 2020.
- BENDER, J. K. *et al.* Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in *enterococci* in Europe: Towards a common nomenclature. **Drug Resistance Updates**, v. 40, p. 25–39, 1 set. 2018.
- BONIFACE, P. K.; BAPTISTA FERREIRA, S.; ROLAND KAISER, C. Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 206, p. 193–223, 12 jul. 2017.
- CARVALHO, P. E. R. Espécies Arbóreas Brasileiras. Embrapa Florestas, Brasília, DF, 2006.
- CARVALHO, P. E. R. Jatobá-do-Cerrado - *Hymenaea stigonocarpa*. Embrapa, Colombo, PR, 2007.
- CASTRO, A. A. J. F. **Comparação florístico-geográfica (Brasil) e fitossociológica (PiauÍ-São Paulo) de amostras de Cerrado**. 1994. 520 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- CONCEIÇÃO, G. M. da; RAMOS, M. M.; LOPES, A. S. **Flora do Cerrado do Município de Caxias (MA): dados preliminares**. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 48., 1997, Crato. Resumos... Crato: Universidade Regional do Cariri: Sociedade Botânica do Brasil, 1997.
- COSTA, I. R. da; ARAÚJO, F. S. de; LIMA-VERDE, L. W. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na Chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 759-770, 2004.
- CHINWUBA, Z. G. *et al.* Determination of the synergy of antibiotic combinations by an overlay inoculum susceptibility disc method. **Arzneimittel-Forschung**, v. 41, n. 2, p. 148–150, 1 fev. 1991.
- CHIOTOS, K. *et al.* Treatment of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections in Children. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 9, n. 1, p. 56–66, 28 fev. 2020.
- DADASHI, M. *et al.* The Global Prevalence of Daptomycin, Tigecycline, and Linezolid-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains From Human Clinical Samples: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 10 set. 2021.

D'ANDREA, M. *et al.* The lytic bacteriophage vB_EfaH_EF1TV, a new member of the Herelleviridae family, disrupts biofilm produced by *Enterococcus faecalis* clinical strains. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 68–75, jun. 2020.

DAS, S. *et al.* Identification and evaluation of quercetin as a potential inhibitor of naphthoate synthase from *Enterococcus faecalis*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 32, n. 11, 28 jul. 2019.

DAVIS, Elyse *et al.* **Epidemiologia da colonização por *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina em instituições de enfermagem.** In: Fórum aberto de doenças infecciosas. EUA: Oxford University Press, p. ofz553, 2020.

DIMECH, G. S. *et al.* Phytochemical and Antibacterial Investigations of the Extracts and Fractions from the Stem Bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and Effect on Ultrastructure of *Staphylococcus aureus* Induced by Hydroalcoholic Extract. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

DIMECH, Gustavo Santiago. **Estudo fitoquímico e antimicrobiano da casca do caule de *Hymenaea stigonocarpa* mart. Ex. Hayne (jatobá).** 2014.

DURIGAN, G.; BAITELLO, J. B.; FRANCO, G. A. D. C.; SIQUEIRA, M. F. de. **Plantas do Cerrado Paulista: imagens de uma paisagem ameaçada.** São Paulo: Instituto Florestal. 2004.

ENDRES, T. M.; TOLTZIS, P. 50 Years Ago in TheJournalofPediatrics: Carbenicillin and Cystic Fibrosis. **The Journal of Pediatrics**, v. 238, p. 214, 1 nov. 2021.

FARIAS, K. DE S. *et al.* Adulteration and Contamination of Commercial Sap of *Hymenaea* Species. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2017, p. 1919474, 2017.

FESSENDEN, R. J. **Organic chemistry.** Boston: Willard Grant Pres, 1982.

GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, 20 mar. 2019.

GÖK, Ş. M. *et al.* Klinik Örneklerden İzole Edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* İzolatlarının Antibiyotik Direnci ve Virülans Faktörlerinin Araştırılması. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 54, n. 1, p. 26–39, 15 jan. 2020.

GOŁAŚ-PRĄDZYŃSKA, M.; ŁUSZCZYŃSKA, M.; ROLA, J. G. Dairy Products: A Potential Source of Multidrug-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains. **Foods**, v. 11, n. 24, p. 4116, 19 dez. 2022.

GOMIDE, L. R. **Um modelo fitogeográfico para a bacia do Rio São Francisco, em Minas Gerais.** 2004. 268 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GONÇALVES, A. R.; CHAVES, L. J.; DE CAMPOS TELLES, M. P. Genetic variability and effective population size in *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae) germplasm collection: tools for breeding programs and genetic conservation. **Genetica**, v. 147, n. 5-6, p. 359–368, 24 set. 2019.

- GU, H. et al. High-Level Antibiotic Tolerance of a Clinically Isolated *Enterococcus faecalis* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 1, 17 dez. 2020.
- HE, Q. et al. Comparative genomic analysis of *Enterococcus faecalis*: insights into their environmental adaptations. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, 11 jul. 2018.
- HEIDARY, M. et al. Daptomycin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.73, n. 1, p. 1–11, 20 out. 2017.
- JOSHI, S.; SHALLAL, A.; ZERVOS, M. Vancomycin-Resistant *Enterococci*. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 4, p. 953–968, dez. 2021.
- KAEWPOOWAT, Q.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Tigecycline: a critical safety review. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 14, n. 2, p. 335–342, 25 dez. 2014.
- KALINA, A. P. The taxonomy and nomenclature of *enterococci*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 20, n. 2, p. 185–189, 1 abr. 1970.
- KHAN, A. et al. Antimicrobial Susceptibility Testing for *Enterococci*. **Journal of clinical microbiology**, 60(9), e0084321. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.00843-21>. Acesso em: 3 fev. 2023.
- KILLEEN, T. J.; GARCIA E. E.; BECK, S. G. Guia de arboles de Bolívia. La Paz: Herbario Nacional de Bolívia; St. Louis: Missouri Botanical Garden, 958 p., 1993.
- KIM, M.-A.; ROSA, V.; MIN, K.-S. Characterization of *Enterococcus faecalis* in different culture conditions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, dez. 2020.
- KIM, Y. B. et al. Molecular characterization of erythromycin and tetracycline-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from retail chicken meats. **Poultry Science**, v. 98, n. 2, p. 977–983, fev. 2019.
- LAISHRAM, S. et al. An Update on Technical, Interpretative and Clinical Relevance of Antimicrobial Synergy Testing Methodologies. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 445–468, out. 2017.
- LEVITUS, M. et al. Vancomycin-Resistant *Enterococci*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513233/>. Acesso em: 6 março 2023.
- LI, G.; WALKER, M. J.; DE OLIVEIRA, D. M. P. Vancomycin Resistance in *Enterococcus* and *Staphylococcus aureus*. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 24, 21 dez. 2022.
- LIMA, F. L. O.; ALMEIDA, P. C.; OLIVEIRA, G. A. L. *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina e a sua disseminação em infecções no ambiente hospitalar. Research, **Society and Development**, v. 9, n. 8, e738986404, 2020.
- LOZANO, C.; TORRES, C. [Update on antibiotic resistance in Gram-positive bacteria]. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 35 Suppl 1, p. 2–8, 1 jan. 2017.

MAKAROV, D. A. *et al.* Antimicrobial resistance of commensal *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from food-producing animals in Russia. **Veterinary World**, p. 611–621, 18 mar. 2022.

MÜHLBERG, E. *et al.* Renaissance of vancomycin: approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 11–16, 1 jan. 2020.

NOH, E. B. *et al.* Antimicrobial resistance monitoring of commensal *Enterococcus faecalis* in broiler breeders. **Poultry Science**, v. 99, n. 5, p. 2675–2683, 1 maio 2020.

O'KENNEDY, R. & THORNES, R. D. **Coumarins: biology, applications and mode of action**. New York: John Willey, 1997.

ORABABA, O. Q. *et al.* A systematic review and meta-analysis on the prevalence of vancomycin-resistant *enterococci* (VRE) among Nigerians. **Porto biomedical journal**, 6(1), e125, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/j.pbj.000000000000125>. Acesso em: 10 fev. 2023.

ORSI, P. R.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: A tropical medicinal plant with intestinal anti-inflammatory activity in TNBS model of intestinal inflammation in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 380–385, 10 jan. 2014.

PARADELLA, T. *et al.* *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. [S.l.:s.n.]. Disponível em: <http://host-article-assets.s3.amazonaws.com/rou/588018097f8c9d0a098b4a37/fulltext.pdf>. Acesso em: 10 março 2023.

Penicillins (4th Generation). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31643749/>. Acesso em: 2 mar. 2023.

PRADA, I. *et al.* *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. v. 24, n. 3, p. 364–72, 2019.

PROCOP, G. W. *et al.* **Koneman. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas: 7.ª edición**. [s.l.] L'hospitalet De Llobregat: Wolters Kluwer, 2018.

RAZA, Taskeen *et al.* *Enterococos* resistentes à vancomicina: Uma breve revisão. **J Pak Med Assoc**, v. 68, n. 5, pág. 768–772, 2018.

REINSETH, IS; OVCHINNIKOV, KV; TONNESEN, HH. *et al.* A questão crescente de *enterococos* resistentes à vancomicina e a solução de bacteriocina. **Probióticos e Antimicro**. Prot. 12, pág. 1203–1217, 2020.

RIVERA, S. L. *et al.* Chemically Induced Cell Wall Stapling in Bacteria. **Cell Chemical Biology**, v. 28, n. 2, p. 213–220.e4, fev. 2021.

ROCHA, D. M. G. C. *et al.* The Neglected Contribution of Streptomycin to the Tuberculosis Drug Resistance Problem. **Genes**, v. 12, n. 12, p. 2003, 17 dez. 2021.

RYBAK, M. J. The Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Vancomycin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. Supplement_1, p. S35–S39, 1 jan. 2006.

SANTOS, M. H. L. C.; REIS, A. T. C. C.; SANTANA, M. L. P.; DIAS, T. M. de O. **Levantamento florístico para a recomposição da mata da Serra do Mimo – Barreiras – Bahia**. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 53., 2002, Recife. Resumos... Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco: Sociedade Botânica do Brasil, 2002.

SCALBERT, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. **Plant Polyphenols**. New York: Plenum Press, p. 259-280, 1992.

SHIVALI PATEL; PREUSS, C. V.; BERNICE, F. **Vancomycin**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459263/>. Acesso em: 10 fev. 2023.

SILVA A, J. *et al.* Prevalencia de *Enterococos* resistentes a antibióticos en águas servidas en el norte de Chile. **Revista médica de Chile**, v. 133, n. 10, out. 2005.

SONG, M. *et al.* Characterization of an *Enterococcus faecalis* Bacteriophage vB_EfaM_LG1 and Its Synergistic Effect With Antibiotic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 16 jul. 2021.

SOUZA, I. M. *et al.* Rethinking the pollination syndromes in *Hymenaea* (Leguminosae): the role of anthesis in the diversification. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 93, n. 4, p. e20191446, 2021.

STERN, J. L.; HAGERMAN, A. E.; STEINBERG, P. D.; MASON, P. K. Phlorotannin-protein interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v.22, p.1887-1899, 1996.

TERRAS, F. R. G., SCHOOFS, H. M. E., THEVISSSEN, H. M. E., BROEKAERT, W. F. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, v.103, p.1311-1319, 1993.

TORRES, C. *et al.* Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, 2 ago. 2018.

TORSSEL, B. G. **Natural product chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism**. New York: John Willey, p. 401, 1989.

VILELA, M. A. **Caracterização molecular de isolados bacterianos apresentando mecanismos de resistência a antimicrobianos que atuam na parede celular**. Tese (Doutorado em Genética) - UFPE, Recife, 2009.

WATERS, M.; TADI, P. **Streptomycin**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555886/>. Acesso em: 21 fev. 2023.

WEBSTER, C. M.; SHEPHERD, M. A mini-review: environmental and metabolic factors affecting aminoglycoside efficacy. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, 9 nov. 2022.

WRIGHT, A. J. The penicillins. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 74, n. 3, p. 290–307, 1 mar. 1999.

YAGHOUBI, S. *et al.* Tigecycline antibacterial activity, clinical effectiveness, and mechanisms and epidemiology of resistance: narrative review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 5 jan. 2021.

ZHANG, Y. & LEWIS, K. F abatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiological Letters**, v.149, p.59-64, 1997.