



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS
LABORATÓRIO DE PESQUISAS DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
E ANTIFÚNGICA



MARIA FRANNIELLY SIMÕES DE MORAIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
2-OXO-2-FENILETIL BENZOATO FRENTE À LINHAGENS DE *Escherichia coli*
PATOGÊNCIAS E DE ORIGEM HOSPITALAR**

**João Pessoa-PB
Agosto/2021**

MARIA FRANNIELLY SIMÕES DE MORAIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
2-OXO-2-FENILETIL BENZOATO FRENTE À LINHAGENS DE *Escherichia coli*
PATOGÊNCIAS E DE ORIGEM HOSPITALAR**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal da Paraíba
como requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos. Área de concentração:
FARMACOLOGIA**

Orientadora: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa-PB

Agosto/2021

M827a Moraes, Maria Franncielly Simoes de.
Avaliação da atividade antibacteriana de
2-OXO-2-feniletil benzoato frente à linhagens de
Escherichia coli patogências e de origem hospitalar /
Maria Franncielly Simoes de Moraes. - João Pessoa,
2021.
61 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Escherichia coli. 2. Atividade antibacteriana. 3.
Compostos orgânicos sintéticos. 4. 2-oxo-2-feniletil
benzoato. 5. Brometo de fenacila. I. Lima, Edeltrudes
de Oliveira. II. Título.

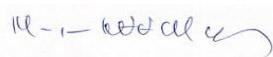
MARIA FRANNCIELLY SIMÕES DE MORAIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
2-OXO-2-FENILETIL BENZOATO FRENTE À LINHAGENS DE *Escherichia coli*
PATOGÊNCIAS E DE ORIGEM HOSPITALAR**

Aprovado em 27 / 08 / 2021
Banca Examinadora



Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Orientadora



Profa. Dra. Margareth de Fatima Formiga Melo Diniz
Examinadora Interna



Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
Examinador Externo

João Pessoa-PB
Agosto/2021

Dedicatória

Dedico este trabalho aqueles que são a base da minha vida:

Dedico este trabalho ao meu tio Claudio e a minha vó Severina, que são as minhas fontes inesgotáveis de amor, paz e apoio. Vocês são meus exemplos de força, determinação, superação e fé!

Agradecimentos

Sou grata a Deus pelo dom da vida, saúde, força e determinação para que este sonho se tornasse realidade. Foi Ele que me sustentou todas as vezes em que a caminhada parecia difícil, quando o desespero, a angústia e os pensamentos negativos me tomavam, era Ele que me tomava pelos seus braços e me mostrava o quanto sou forte e que Ele jamais me abandonaria ou me proporcionaria algo que me julgassem incapaz. Sonhei e Ele realizou!

Ao meu tio Claudio e minha avó Severina, que sempre acreditaram, apoiaram e sonharam comigo. Mesmo diante das dificuldades, nunca me deixaram desistir. Apesar da distância, se fizeram presentes em todos os momentos com palavras que conseguiam acalmar meu coração nos momentos em que mais precisei. Sou grata à Deus pela família que Ele me deu. Obrigada por tudo. À vocês devo tudo que sou!

Ao meu avô João Ribeiro e meu tio Claudemir Ribeiro (*in memoriam*), que mesmo não estando mais presentes fisicamente, sei que continuam cuidando de mim. Está sendo muito difícil sem vocês aqui, mas tento seguir o exemplo de força que aprendi com vocês. Para sempre os amarei!

À toda minha família, mãe, irmã, tios, tias, primos, primas, padrinho, madrinhas e afilhado, pelo apoio durante todos esses anos.

Ao meu noivo, Hollos Lobão, por sempre me apoiar, incentivar e acreditar que sou capaz. Obrigada por todo carinho, cuidado, amor e paciência. Obrigada por fazer dos meus sonhos os seus!

À minha amiga-irmã Kallyne Medeiros, um dos melhores presentes da graduação! Gratidão por amizade, amor, conselhos e por todos os momentos de alegria e tristeza que compartilhamos.

Aos meus amigos de profissão, Karina Henrique, Rafael Leite, Thercio Rosas e Gabriela Moura. Obrigada por cada palavra de apoio, por cada momento compartilhado e por me ajudarem a carregar o fardo quando eu não mais consegui carregar sozinha. Tenho certeza que sem vocês, tudo teria sido muito mais difícil. Amo vocês!

À todos os meus colegas de turma e de laboratório, pelo companheirismo, ajuda e sonhos compartilhados.

Às minhas eternas professoras, Luiza Maciel (*in memoriam*) e Mônica Rodrigues, pelos conhecimentos transmitidos, amizade e por todo amor. Vocês fazem parte dessa vitória!

À minha querida orientadora *Edeltrudes de Oliveira Lima*, pela confiança, oportunidade e compreensão. És um exemplo de profissional e ser humano.

À banca examinadora, Profa. Dra. Margareth de Fatima Formiga Melo Diniz e Prof. Dr. Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade e pelo enriquecimento da realização desta tão sonhada conquista.

Por fim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste sonho e para o início de muitos outros. Gratidão!

RESUMO

MORAIS, M.F.S. Avaliação da atividade antibacteriana de 2-oxo-2-feniletil benzoato frente à linhagens de *Escherichia Coli* patogênicas e de origem hospitalar, 2021. 62p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) CCS/UFPB, João Pessoa.

Escherichia coli, pertencente à família Enterobacteriaceae, é um micro-organismos de grande importância para a saúde pública e devido à sua elevada recorrência em doenças, tanto no ambiente hospitalar como na comunidade, constitui uma das espécies mais pesquisadas no mundo. Possuem considerável capacidade de adaptação e de desenvolver resistência aos antibióticos, ocupando o terceiro lugar na lista dos “12 patógenos prioritários” resistentes a antibióticos descritos pela Organização Mundial da Saúde. A incidência dessas infecções tem aumentado ao longo das décadas, apresentando altas taxas de mortalidade com frequentes falhas terapêuticas, aumentando a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas que sejam eficazes no combate a estes microrganismos. Nesse sentido, os compostos orgânicos sintéticos constituem uma importante fonte de novas substâncias e tem auxiliado na descoberta de terapias que melhoraram, significativamente, a saúde humana. Diante disso, este estudo avaliou a atividade antibacteriana da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato contra 15 linhagens clínicas de *Escherichia coli* através de ensaios realizados *in vitro*. A atividade antibacteriana foi avaliada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e estudos de associação da molécula de 2-oxo-2-feniletil benzoato com um antibiótico-padrão (Imipeném) através da obtenção do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). Na avaliação da atividade antibacteriana, a substância apresentou CIM de 256 µg/mL e CBM de 1024 µg/mL. Logo, pode-se considerar a atividade antibacteriana da molécula-teste como forte. A associação da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato com Imipeném apresentou efeito de indiferença tanto para linhagem clínica E.C 706 quanto para cepa ATCC-25922. Dessa maneira, reforça-se a necessidade de novos estudos com estratégias, abordagens e tecnologias inovadoras, de modo a elucidar e detalhar por outras vias metodológicas as potencialidades farmacológicas da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato, contribuindo para descoberta de um novo candidato à fármaco.

PALAVRAS-CHAVE: *Escherichia coli*, atividade antibacteriana, compostos orgânicos sintéticos, 2-oxo-2-feniletil benzoato, derivados de brometo de fenacila.

ABSTRACT

MORAIS, M.F.S. Avaliação da atividade antibacteriana da 2-oxo-2-feniletil benzoato frente à linhagens de *Escherichia coli* patogênicas e de origem hospitalar, 2021. 62p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) CCS/UFPB, João Pessoa.

Escherichia coli, belonging to the Enterobacteriaceae family, is a micro-organism of great importance to public health and due to its high recurrence in diseases, both in the hospital environment and in the community, it is one of the most researched species in the world. They have the ability to adapt and develop resistance to antibiotics, ranking third in the list of the “12 priority pathogens” resistant to antibiotics prepared by the World Health Organization. The incidence of these occurrences has increased over the decades, high mortality rates with occurrences. There is an increasing need to find new substances with antimicrobial properties that are effective in combating these microorganisms. In this sense, synthetic organic compounds, an important source of new substances and have helped in the discovery of many therapies that improve, complement, human health. Therefore, this study evaluated the antibacterial activity of the 2-oxo-2-phenylethyl benzoate molecule against 15 clinical strains of *Escherichia coli* through in vitro assays. The antibacterial activity was evaluated through the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the Minimum Bactericidal Concentration (CBM) and studies of the association of the 2-oxo-2-phenylethyl benzoate molecule with a standard antibiotic (Imipenem) through the installation of the Index of the Fractional Inhibitory Concentration (ICIF). In the evaluation of antibacterial activity, a presenting substance CIM of 256 µg / mL and CBM of 1024 µg / mL. Therefore, an antibacterial activity of the test molecule can be considered as strong. The association of the 2-oxo-2-phenylethyl benzoate molecule with Imipenem showed an indifference effect both for the E.C 706 clinical lineage and for the ATCC-25922 strain. Thus, the need for further studies with innovative strategies, approaches and technologies is reinforced, in order to elucidate and follow other methodological paths such as pharmacological potential of the 2-oxo-2-phenylethyl benzoate molecule, contributing to the discovery of a new candidate to the drug.

KEY WORDS: *Escherichia coli*, antibacterial activity, synthetic organic compounds, 2-oxo-2-phenylethyl benzoate, phenacyl bromide derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem de Microscopia Eletrônica de células estreptocócicas. Ampliação: $\times 12.000$	21
Figura 2: Formas e arranjos das células bacterianas.....	21
Figura 3: Microscopia eletrônica de cepas de <i>E. coli</i> com expressão de fímbrias.....	24
Figura 4: Estrutura das Cefalosporinas.....	28
Figura 5: Classificação dos antibióticos e mecanismo de ação.....	30
Figura 6: Estrutura molecular de 2-oxo-2-feniletil benzoato.....	31

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Fatores de virulência da <i>E.coli</i> : toxinas e mecanismos de ação.....	25
Quadro 2: Principais características das cepas patogênicas da <i>Escherichia coli</i>	26
Tabela 1: Cepas bacterianas da <i>Escherichia coli</i> e origem.....	38
Tabela 2: Média dos resultados da avaliação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> - Técnica de Microdiluição.....	43
Tabela 3: Média dos resultados da avaliação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do Imipeném contra cepas de <i>Escherichia coli</i> - Técnica de Microdiluição.....	46
Tabela 4: Média dos resultados da avaliação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do Cefepime frente cepas de <i>Escherichia coli</i> - Técnica de Microdiluição.....	47
Tabela 5: Resultados da avaliação da Técnica de Checkerboard.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DAEC	Escherichia coli aderente difusa
DEC	Escherichia coli diarréogênicas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAEC	Escherichia coli enteroaggregativa
EHEC	Escherichia coli enterohemorrágica
EIEC	Escherichia coli enteroinvasora
EPEC	Escherichia coli enteropatogênica
ETEC	Escherichia coli enterotoxigênica
ExPEC	Escherichia coli extraintestinais
ICIF	Índice da concentração inibitória fracionada
ITU	Infecções do trato urinário
MDR	multidroga-resistente
ME	Microscopia eletrônica
MNEC	Escherichia coli associada à meningite
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAV	Pneumonia associada à ventilação
RNA	Ácido Desoxirribonucleico
SHU	Síndrome Hemolítico- urêmica
UFC	Unidade formadora de colônias
UPEC	Escherichia coli uropatogênica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Espécies bacterianas.....	20
2.2 <i>Escherichia Coli</i>	23
2.3 Tratamento e resistência bacteriana.....	27
2.4 Compostos orgânicos sintéticos.....	31
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Local de pesquisa.....	37
4.2 Linhagens bacterianas.....	37
4.3 Meio de cultura.....	38
4.4 Inóculo.....	38
4.5 Molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato e antibacterianos-padrões.....	38
4.6 Métodos.....	39
4.6.1 Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	39
4.6.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	39
4.6.1.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	40
4.6.1.3 Ensaio de associação através do método checkerboard.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato.....	43
5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos antibacterianos-padrões.....	45
5.3 Ensaio de associação através do método Checkerboard.....	48
6 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	52

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, observou-se um importante declínio na carga associada às doenças infecciosas no mundo, graças aos esforços deliberados, entre os quais o saneamento, abastecimento de água, alimentação segura, vacinas e antibióticos possuem destaque. Doenças como a varíola e peste bovina, antes responsáveis por milhares de mortes, encontram-se erradicadas e muitas outras doenças transmissíveis vêm apresentando considerável redução de casos em muitos países (ROSER et al., 2014; TULCHINSKY; VARAVIKOVA, 2014; DAVGASUREN et al., 2019).

Apesar dos avanços, as doenças infecciosas ainda representam uma grande ameaça à saúde pública no século XXI. Segundo o Estudo de Carga Global de Doenças, em 2018, cerca de 7,069 milhões de pessoas morreram de doenças infecciosas em todo o mundo, representando 12,6% das mortes globais (ROTH et al., 2018). Destaca-se que cerca de 13% das mortes no mundo estão relacionadas a doenças infecciosas bacterianas, incluindo doenças respiratórias e tuberculose, a cada ano (VOUGA; GREUB, 2016).

Embora as infecções bacterianas sejam mais fáceis de tratar do que as virais, tendo em vista o arsenal de agentes antibióticos disponível no mercado (DORON; GORBACH, 2008), a redução drástica de novos medicamentos e de investimentos para o seu desenvolvimento associada ao rápido crescimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos constitui uma ameaça real com consequências, potencialmente, devastadoras (SILVA; JÚNIOR SILVA, 2015), tornando o tratamento seguro e eficaz desses agravos um grande desafio.

No ambiente hospitalar, as bactérias patogênicas estão presentes em cerca de 70% das infecções nosocomiais (IN), também conhecidas como infecção adquirida em hospital, são responsáveis por elevadas taxas de morbimortalidade, aumento da permanência hospitalar e custos consideráveis dos cuidados de saúde (AGABA et al., 2017). Dentre as principais bactérias associadas a INs destaca-se a *Escherichia coli* (DAVOUDI et al., 2014; TOLERA; ABATE; DHERESA; MARAMI, 2018).

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa e faz parte da microbiota intestinal comensal de vertebrados (MICENKOVÁ et al., 2017). Em humanos, sua prevalência é superior a 90% com uma concentração por grama de fezes de 10^7 a 10^9 unidades formadoras de colônias

(DENAMUR et al., 2020). No entanto, cepas patogênicas, também conhecidas como patótipos, são causadoras de infecções intestinais e extraintestinais (USEIN et al., 2016).

A incidência de infecções por cepas patogênicas da *E. coli* está aumentando em humanos, bem como a resistência antimicrobiana tornando-a digna de ocupar o terceiro lugar na lista dos “12 patógenos prioritários” resistentes a antibióticos descritos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Tal fenômeno representa um grande obstáculo no tratamento dessas doenças e aumenta a necessidade de novas estratégias e coordenação na saúde pública de modo a produzir novos potenciais terapêuticos com segurança e eficácia farmacológica (WHO, 2014; DENAMUR et al., 2020; VIHTA et al., 2018; CASSINI et al., 2019).

A eficácia do tratamento das infecções causadas por *E. coli*, portanto, depende, entre outros, da administração do medicamento na dose certa e durante o tempo apropriado, através do diagnóstico correto conforme os sinais e sintomas descritos pelo paciente e indispensavelmente com a ajuda dos exames laboratoriais, a exemplo da cultura bacteriana e do antibiograma (REVELAS, 2012; CASTANHEIRA, 2013). Esses exames laboratoriais permitem o estudo da susceptibilidade das bactérias aos antibióticos e é o primeiro passo para estabelecer recomendações para um tratamento eficaz (LAGIER et al., 2015).

Frequentemente, nos ambientes hospitalares e em situações de início urgente de antibioticoterapia, o uso empírico de antibióticos se faz necessário, pois os resultados laboratoriais geralmente não estão prontamente disponíveis devido ao tempo necessário para que haja o crescimento bacteriano. A “descalação” ou redução da escalada envolve o início precoce da antibioticoterapia de amplo espectro em pacientes com perfil reservado e sem a disponibilidade de resultados de exames. A diminuição progressiva de antibióticos acompanha a disponibilidade desses resultados (REVELAS, 2012; CASTANHEIRA, 2013).

Habitualmente, os antibióticos de primeira escolha para o tratamento de infecções por *E. coli* são os β-lactâmicos pertencentes a classe das penicilinas, como a ampicilina, que agem como inibidores da síntese da parede celular (CASTANHEIRA, 2013). Entretanto, quando a cepa se mostra resistente aos mesmos, é recomendado o uso de cefalosporinas, carbapenêmicos, sulfonamidas, aminoglicosídeos e fluorquinolonas (CERF, CARPENTIER, SANDERS, 2010; RANG et al., 2015).

A resistência bacteriana, além de representar um problema crescente e global, é o resultado inevitável do uso intensivo e indiscriminado de antibióticos e da inata capacidade

adaptativa dos microrganismos de desenvolverem mecanismos de resistência que, por consequente, restringe as opções farmacológicas de tratamento (KUNIN, LIU, 2002; DIAS et al., 2010). Vale salientar que as bactérias resistentes são, particularmente comuns, no ambiente hospitalar (HOCQUET; MULLER; BERTRAND, 2016) e vários isolados de *E. coli* já foram identificados com um alto nível de virulência e genes de resistência a antibióticos (MOMTAZ et al., 2013; HEIDARY; MOMTAZ; MADANI, 2014; RANJBAR et al., 2017).

Toda essa problemática impulsiona a busca por novas fontes de substâncias com ação antibacteriana, que tenham menos efeitos indesejáveis, baixo custo e maior segurança e eficácia através, por exemplo, da síntese de moléculas orgânicas (VICENTINI et al., 2007; BARROS, 2014; CAVALEIRO et al., 2015).

Nessa perspectiva, pode-se inferir que é necessária a realização de estudos que investiguem o potencial antibacteriano de substâncias sintéticas, como a molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato frente à linhagens clínicas, com o objetivo de avaliar se tem atividade antibacteriana, seja isoladamente ou em associação com outros antibacterianos já utilizados e, posteriormente, analisar a sua inserção como uma opção terapêutica, seja auxiliando na melhora da eficácia ou evitando sua inibição proveniente de mecanismos de resistência. Portanto, este trabalho de pesquisa propôs avaliar a atividade antibacteriana da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato contra linhagens clínicas de *E. coli* e sua associação aos antimicrobianos na busca de uma nova alternativa no combate de infecções bacterianas causadas por essa espécie. É importante destacar que, por se tratar de uma substância recentemente sintetizada, a literatura científica acerca de sua bioatividade ainda é escassa.

Referencial teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Espécies bacterianas

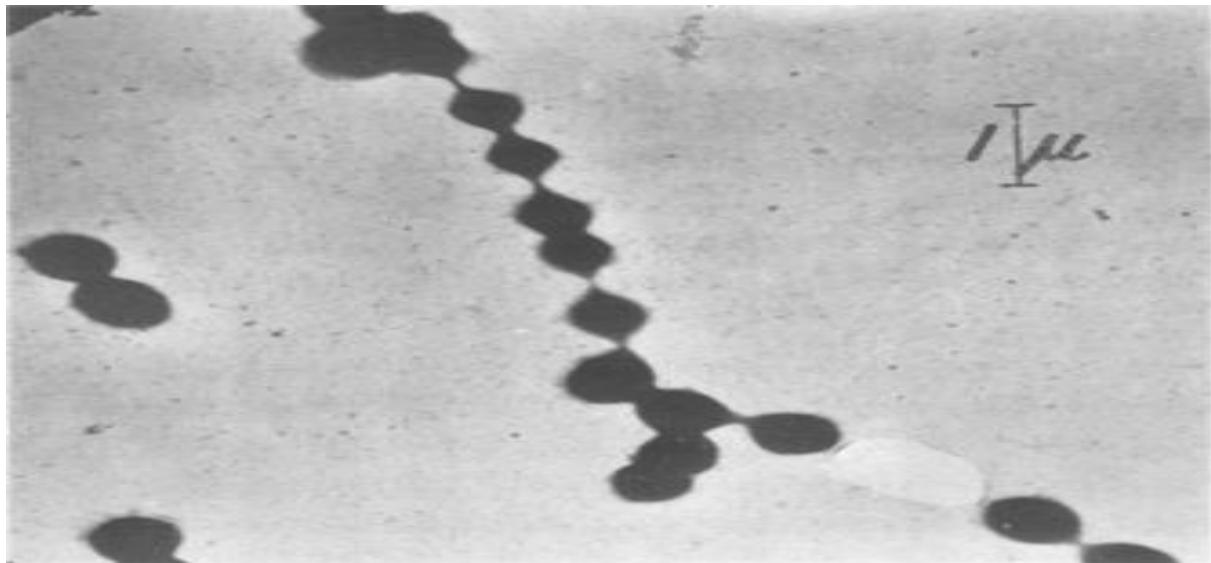
As bactérias foram descritas e documentadas pela primeira vez no século XIII pelo naturalista holandês Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723) com a ajuda de um dos diversos microscópios que ele havia construído, nomeando-as de *animaculus* (PORTER, 1976). Desde então, a bacteriologia tem evoluído exponencialmente e contribuído para importantes descobertas e para o avanço das ciências da saúde.

O estudo das características das bactérias tem auxiliado os estudiosos há mais de 200 anos (PORTER, 1976) e seu conhecimento tem sido muito importante para o melhor entendimento da fisiologia bacteriana, mecanismos patogênicos, características antigênicas e identificação de espécies, além de se mostrar uma ferramenta útil no diagnóstico de doenças e na prevenção de infecções (ZHOU; LI, 2015; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

As bactérias são microrganismos procariotos e unicelulares. São, metabolicamente, ativas e se dividem por fissão binária. Podem se multiplicar em taxas rápidas e existem em diferentes formas (parasitárias e de vida livre), as quais utilizam uma enorme variedade de substratos para sobreviver. Seu tamanho é da ordem de milésimos de milímetro, podendo ser observadas em microscopia ótica (BARON, 1996; MOLINARO, 2009).

As células bacterianas apresentam variadas formas e as primeiras evidências surgiram em 1675 com Antony van Leeuwenhoek, o qual relatou as primeiras descrições desses microrganismos (por exemplo, espirais, hastes, etc.) usando técnicas de microscopia. Somente 300 anos depois as observações de alta resolução da morfologia celular foram relatadas por meio da Microscopia Eletrônica (ME) (Figura 1) (MUDD, POLEVITZKY, ANDERSON, & CHAMBERS, 1941).

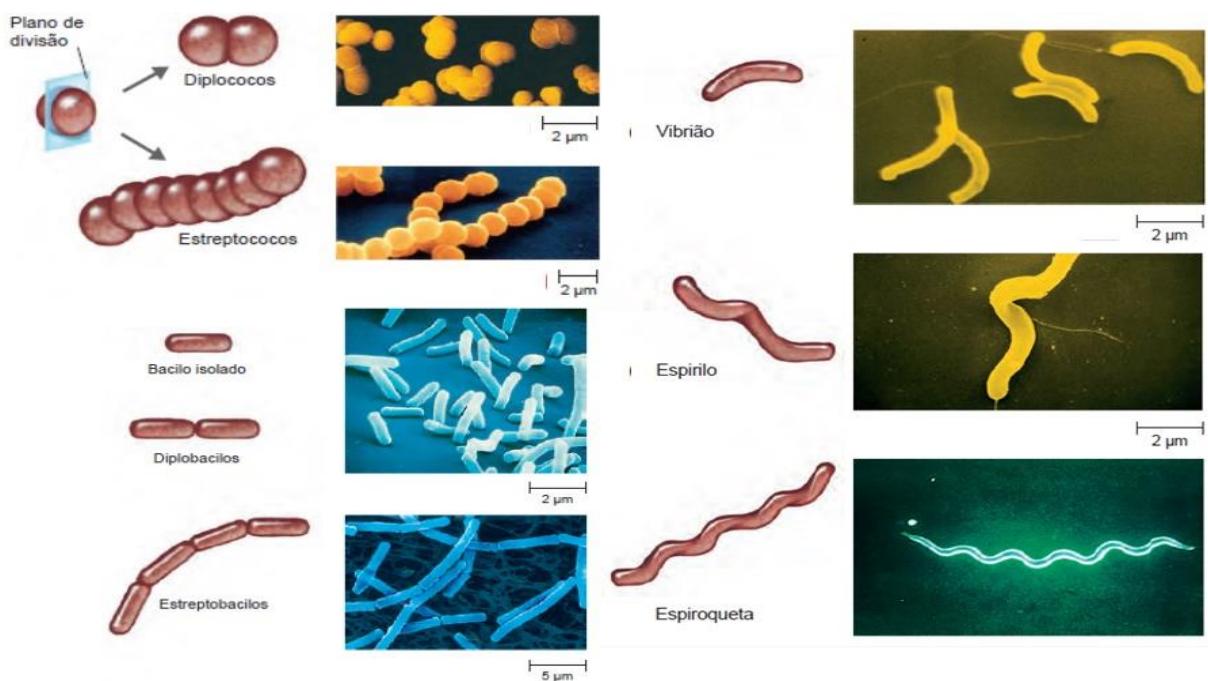
Figura 1. Imagem de Microscopia Eletrônica de células estreptocócicas. Ampliação: $\times 12.000$



Fonte: MUDD et al., 1941.

Embora sejam seres unicelulares, as bactérias são microrganismos complexos e altamente variáveis. Morfologicamente, possui três formas básicas: esférica (cocos), em forma de bastonete (bacilos) e em espiral (espiroqueta). As bactérias se organizam em pares, cadeias ou outros arranjos e tais formações geralmente são características de um gênero particular ou uma espécie de bactérias (Figura 2) (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

Figura 2. Formas e arranjos das células bacterianas



Fonte: TORTORA; CASE; FUNKE, 2016.

As células bacterianas são envolvidas por uma parede celular, a qual é predominantemente composta por um complexo de carboidratos e proteínas chamado de peptídeoglicano. A depender da espécie da bactéria, é possível observar na parte externa desse envoltório, estruturas como flagelos e fímbrias, determinantes, respectivamente, para a movimentação e adesão celular (BURTON; ENGELKIRK, 2012).

Assim como os organismos não procariontes, as células bacterianas possuem uma membrana plasmática semipermeável e seletiva, constituída de fosfolipídios e proteínas, todavia, com exceção do grupo bacteriano dos micoplasmas, não possuem esteróis. A membrana plasmática bacteriana também atua em numerosos processos biossintéticos (MOLINARO, 2009).

Diferentemente das células eucariontes, o citoplasma das células bacterianas não possui organelas ligadas à membrana plasmática. Consequentemente, seu material genético não é envolto por membrana nuclear, uma característica dos seres procariontes (BURTON; ENGELKIRK, 2012). No entanto, seu citoplasma é rico em Ácido Desoxirribonucleico (RNA) e ribossomos, essenciais à síntese proteica, possuindo em sua composição, aproximadamente, 60% de RNAs e 40% de proteínas (MOLINARO, 2009).

Embora possam parecer organismos de formas de vida relativamente simples, as bactérias são sofisticadas, altamente adaptáveis e possui um robusto aparato transformador de energia. Estas se utilizam do metabolismo, representado por todas as reações bioquímicas que ocorrem em uma célula, para produção de energia (BURTON; ENGELKIRK, 2012).

Para tanto, contam com a ajuda de um sistema enzimático integrado para realizar diferentes reações químicas necessárias à funcionalidade e reprodução bacteriana e assim como as células eucariontes, utilizam moléculas de Adenosina Trifosfato (ATP) como fonte de energia primária (BURTON; ENGELKIRK, 2012; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

Do ponto de vista metabólico, as bactérias podem ser classificadas como heterotróficas, autótrofas e fototróficas. As bactérias heterotróficas (ou quimiorganotróficas), que incluem todos os patógenos, obtêm energia a partir da oxidação de compostos orgânicos, principalmente carboidratos, lipídios e proteínas, resultando na síntese de ATP como fonte de energia química (DOELLE, 2014).

As bactérias autótrofas, ou simplesmente quimiolitotróficas, crescem à custa de compostos inorgânicos (íons minerais), sem usar a luz do sol como fonte de energia. A fonte de energia para esses organismos é a oxidação de compostos inorgânicos específicos. Já as bactérias fototróficas, também conhecidas como fotossintéticas, contêm pigmentos que as permitem utilizar a luz solar para produzir compostos, podendo ser orgânicos ou inorgânicos (GREGERSEN; BRYANT; FRIGAARD, 2011; DOELLE, 2014).

Por fim, o conhecimento acerca das características, em especial, do metabolismo bacteriano (por exemplo, biossíntese de proteínas, replicação de Ácido Desoxirribonucleico - DNA) é imperativo para condução dos estudos que buscam o desenvolvimento de antibióticos tendo em vista que a eficácia desses agentes está diretamente relacionada as consequências metabólicas na célula bacteriana (STOKES; LOPATKIN; LOBRITZ; COLLINS, 2019).

2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo gram-negativo não esporulante, anaeróbio facultativo pertencente à família *Enterobacteriaceae* e devido à sua importância para a saúde pública e à sua recorrência em doenças constitui uma das espécies mais pesquisadas no mundo. É um membro importante da microbiota intestinal normal de humanos e outros animais homeotérmicos e um dos primeiros microrganismos a colonizar o trato gastrointestinal (TGI) de bebês recém-nascidos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MUELLER; Tainter, 2020).

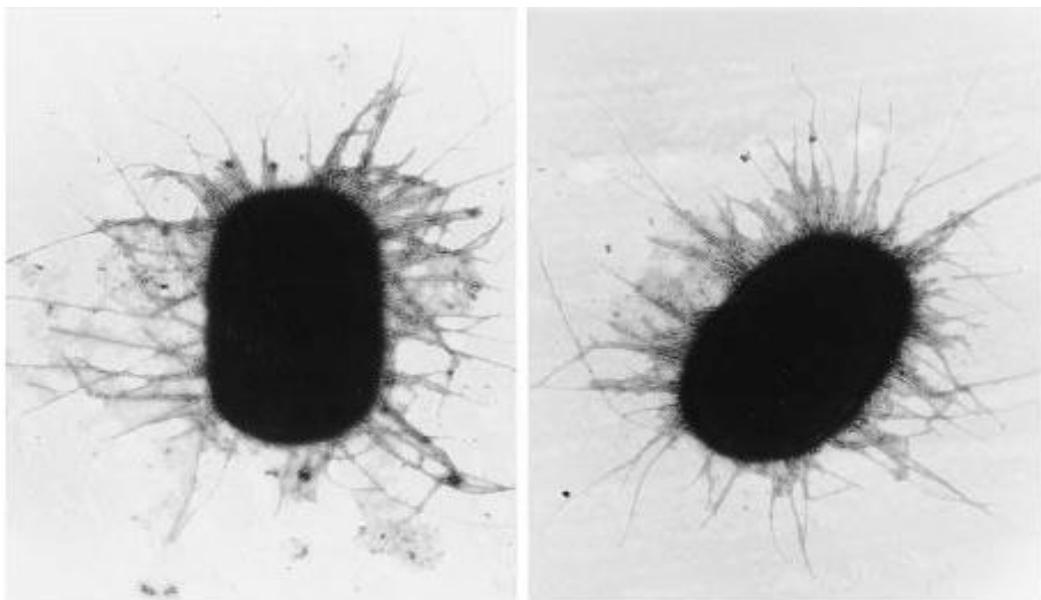
Embora *E. coli* e seu hospedeiro humano coexistam com benefícios mútuos por décadas, essa bactéria está associada a uma variedade de doenças e possui uma ampla diversidade de cepas patogênicas, sendo alguns sorotipos associados à maior virulência (p. ex., *E.coli* O157 responsável pela colite hemorrágica e síndrome hemolítico- urêmica - SHU). A maioria das infecções é endógena, demonstrando que a *E. coli* é capaz de estabelecer infecção quando as defesas do paciente estão comprometidas ou quando há dano na barreira gastrointestinal (MURRAY et al., 2004; MUELLER; Tainter, 2020).

E. coli possui uma ampla variedade de fatores de virulência, além dos fatores comuns a todos os membros da família *Enterobacteriaceae*, conferindo-lhes maior capacidade de adaptação a novos nichos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004), de escapar das defesas do hospedeiro e desenvolver resistência aos antibióticos (MUELLER; Tainter, 2020).

Didaticamente, dividi-se os fatores de virulência em duas categorias: fatores de adesão e toxinas.

Os fatores de adesão, também chamados de adesinas, são representados por estruturas celulares presentes na parede celular bacteriana que promovem a adesão a outras bactérias ou ao hospedeiro (p.ex. fímbrias, fibrilas) sendo considerados importantes fatores de virulência para a colonização (Figura 3). Graças aos fatores de adesão, as cepas patogênicas da *E. coli* podem colonizar locais que normalmente não habita, como o intestino delgado e a uretra, causando a infecção (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MURRAY et al., 2004).

Figura 3. Microscopia eletrônica de cepas de *E. coli* com expressão de fímbrias.



Fonte: SOKURENKO et al., 1997.

As toxinas são proteínas ou moléculas produzidas pelas bactérias que provocam alterações na função celular e incluem enzimas citolíticas e receptores de proteínas. São basicamente classificadas em duas categorias principais: exotoxinas ou endotoxinas. As exotoxinas são liberadas imediatamente no ambiente circundante, enquanto as endotoxinas só são liberadas quando a bactéria é morta pelo sistema imunológico (MURRAY et al., 2004; GUPTA, 2018).

A ação das toxinas pode resultar na morte celular através da interrupção das vias metabólicas no eucarioto hospedeiro e os mecanismos principais são dano na membrana plasmática, interrupção da síntese proteica, inibição da liberação de neurotransmissores e ativação do sistema imunológico do hospedeiro (GUPTA, 2018). As principais toxinas

produzidas pelas bactérias do gênero *E.coli* e seus respectivos mecanismos de ação estão descritos no quadro abaixo:

Quadro 1. Fatores de virulência da *E.coli*: toxinas e mecanismos de ação.

Toxina*	Patótipo	Mecanismo de ação
LT (Heat-labile-enterotoxin)	ETEC	ADP-ribosilação e ativação da adenilato ciclase resultando na secreção de íon
Stx (Shiga toxin)	EHEC	Depurinação rRNA, inibição da síntese proteica, indução da apoptose
Cytotoxic necrotizing toxin (CNT)	Vários	Atividade DNase I, bloqueio da mitose na fase G2/M
Shigella Enterotoxin 1 (ShET1)	EAEC, EIEC	Secreção iônica
Urease	EHEC	Clivagem da ureia em NH3 e CO2
EspC	EPEC	Serino-proteases, secreção iônica
EspP	EHEC	Serino-proteases, clivagem do fator V de coagulação
Haemoglobin-biding protease (Tsh)	ExPEC	Degradação da hemoglobina
Pet	EAEC	Citotoxicidade, serino-proteases, secreção iônica
Pic	UPEC, EAEC, EIEC	Proteases, mucinases
IpaA	EIEC	Ação despolimerizante
Cycle-inhibiting fator (CIF)	EPEC, EHEC	bloqueio da mitose na fase G2/M, inativação da CDK1
Cytotoxin necrotizing factors (CNF-1,-2)	MNEC, UPEC, NTEC	Alteração do citoesqueleto, necrose
Shigella Enterotoxin 2	EIEC, ETEC	Secreção iônica
Heat-stable enterotoxin a,b (Sta, STb)	ETEC	Ativação da guanilato ciclase, aumento do cálcio intracelular, secreção iônica

Notas: Adaptado de KAPER et al, 2004. *siglas no idioma original. Legenda: EAEC (*E.coli* enteroaggregativa); EIEC (*E.coli* enteroinvasiva); UPEC (*E.coli* uropatogênica); MNEC (*E.coli* associada à meningite); NTEC (*E.coli* necrotoxica).

A espécie patogênica de *E. coli* está subdividida em dois grandes grupos: *E. coli* diarréogênica (DEC) e *E. coli* extraintestinal (ExPEC). No que se diz respeito ao primeiro grupo, é classificado em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroaggregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) (NATARO et al., 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TENG et al., 2004; NGUYEN et al. 2005).

As duas principais cepas patogênicas pertencentes as ExPEC descritas na literatura são *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* associada à meningite (MNEC). As principais características das cepas patogênicas *E.coli* estão descritas no quadro 2.

Quadro 2. Principais características das cepas patogênicas da Escherichia Coli.

Grupo do patótipo	Patótipo	Sítio de ação	Doença	Patogênese
DEC	EPEC (<i>E. coli</i> enteropatogênica)	Intestino delgado	Diarreia infantil em países em desenvolvimento, diarreia aquosa e vômitos	Adesão e ativação do sistema imunológico (intimina)
DEC	EHEC (<i>E. coli</i> enterohemorrágica)	Intestino grosso	Diarreia aquosa à colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU)	Toxinas (Stx ou VT-verocitoxina) ocasiona necrose e perfuração intestinal
DEC	ETEC (<i>E. coli</i> enterotoxigênica)	Intestino delgado	Diarreia infantil aquosa de leve à grave, diarreia dos viajantes	Adesão e toxinas (fatores proteicos de colonização fimbrial ou fibrilar (CFs), enterotoxinas termolábeis (LTs) e as termoestáveis (STs))
DEC	EAEC (<i>E. coli</i> enteroaggregativa)	Intestino delgado	Diarreia aquosa persistente, diarreia infantil, diarreia do viajante	Adesão (fimbrias de aderência agregativa - AAFs – nas células Hep-2)
DEC	EIEC (<i>E. coli</i> enteroinvasora)	Intestino grosso	diarreia aquosa à colite inflamatória invasiva	Toxinas (secretaria proteínas multiplas, como IpaA, IpaB, IpaC e IpgD, que medeiam eventos de sinalização epitelial, rearranjos citoesqueléticos, captação celular, lise do vacúolo endocítico)
DEC	DAEC (<i>E. coli</i> aderente difusa)	Intestino delgado	Diarréia infantil	Adesão (adesina fimbrial - F1845)
ExPEC	UPEC (<i>E. coli</i> uropatogênica)	Trato Urinário	Infecções do Trato Urinário – ITUs (cistite não complicada e pielonefrite aguda)	Adesão e toxinas (Adesinas P (Pap), hemolisina, fator necrotizante citotóxico, protease autotransportada – Sat)
ExPEC	MNEC (<i>E. coli</i> associada a meningite)	Sistema sanguíneo e sistema nervoso central	Meningite Neonatal Sepse precoce	Provável adesão e consequente dano microvascular endotelial cerebral

Notas: Adaptado de MURRAY & KAPER et al, 2004. *siglas no idioma original.

E. coli compõe um grupo de grande relevância clínica por estar relacionada a uma ampla variedade de doenças em todo o mundo. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), cepas diarreogênicas da *E.coli* transmitidas por alimentos causou mais de 60 mil mortes em 2010 (HAVELAAR et al., 2015).

E. coli é uma das principais causas de infecções hospitalares, incluindo infecções do trato urinário (ITUs) associadas a cateter, pneumonia associada à ventilação (PAV) e bacteremia. Estima-se que cerca de 50% das ITUs, 30% das meningites em neonatos (FOXMAN, 2014; MORA-RILLO et al., 2015; DESVAUX et al., 2020) e 27% das bacteremias adquiridas nos hospitais estejam relacionadas a *E.coli* (BONTEN et al., 2021).

Destaca-se que a alta prevalência das infecções por *E.coli* tem contribuído consideravelmente para o aumento da permanência hospitalar prolongada, incapacidade de longo prazo, resistência antimicrobiana, custos socioeconômicos e da taxa de mortalidade (JAYANTHI, 2014; CDC, 2017; MOHAMMED; MUSSE, 2020). Nesta perspectiva, torna-se particularmente importante, a implementação de estratégias visando a prevenção e controle de infecções hospitalares, o uso racional de antimicrobianos e o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas farmacológicas com segurança e eficácia comprovadas.

2.3 Tratamento e Resistência Bacteriana

Nas últimas décadas, a preocupação com o aumento da resistência antimicrobiana entre as cepas da *Escherichia coli* tem ensejado a busca por novas alternativas terapêuticas, mas apesar desses desafios, há um grande arsenal de antimicrobianos, os quais representam diversas opções para o tratamento contra infecções por *E. Coli*. Nos países em desenvolvimento, a disponibilidade de teste antimicrobiano para detecção da cepa é incipiente. Logo, justifica-se a necessidade de conhecer os padrões locais de suscetibilidade para nortear o tratamento (PITOU, 2012a).

Dentre os antibióticos mais utilizados no tratamento de infecções comunitárias e hospitalares por *E.coli*, as cefalosporinas, fluroquinolonas e sulfametoxazol associado com trimetoprima são considerados os de primeira escolha. Em geral, a monoterapia com esses antimicrobianos é eficaz para a maioria das infecções, no entanto, o uso de agentes de amplo espectro são amplamente utilizados especialmente no contexto hospitalar (CERF, CARPENTIER, SANDERS, 2010).

As cefalosporinas, pertencentes a classe dos β -lactâmicos, são antimicrobianos de amplo espectro. Em geral, as cefalosporinas de terceira geração possuem atividade mais potente contra

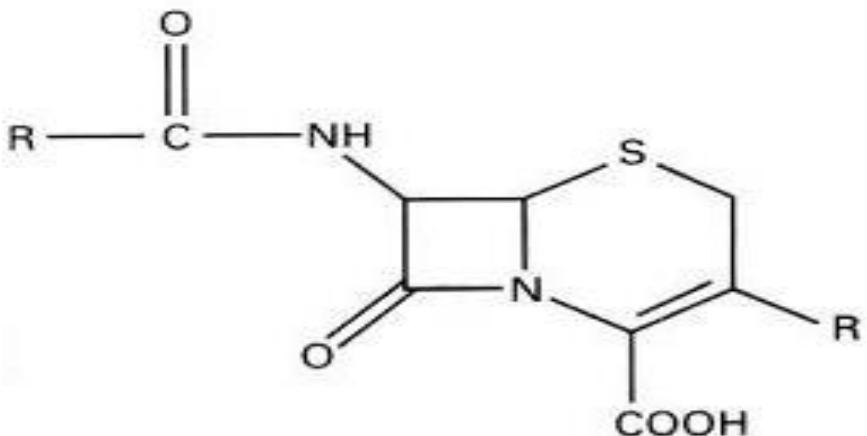
bacilos gram-negativos facultativos. No Brasil, as drogas disponíveis para uso que compõe esse grupo são ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima (todas na apresentação parenteral) (BRASIL, 2007; CASTANHEIRA, 2013).

O mecanismo de ação das cefalosporinas envolve o bloqueio da síntese da parede celular ao se ligar e inibir as proteínas de ligação de penicilina envolvidas nas reações de transpeptidação e carboxipeptidase na síntese de peptidoglicano da parede celular. As cefalosporinas de terceira geração constituem uma das principais classes de medicamentos usadas para tratar infecções graves de início na comunidade ou adquiridas em hospitais causadas por ExPEC (PITOUT, 2012a; 2012b; SHEPHERD; POTTINGER, 2013).

No entanto, o aumento da resistência antimicrobiana tem ameaçado o tratamento com o uso das cefalosporinas (Figura 4), consideradas agentes de grande importância farmacológica. A produção de enzimas β -lactamases, tem sido relatada em muitos estudos. À estas enzimas são conferidas o poder de hidrolisar o anel beta-lactâmico pela quebra da ligação amida, perdendo assim, a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (WILLIAMS, 1999; PITOUT, 2012a; 2012b).

Figura 4. Estrutura das cefalosporinas.

Cefalosporinas



Fonte: WILLIAMS, 1999.

Estudos de farmacovigilância realizados durante os anos 2000 na Europa, América do Norte e do Sul, mostraram que entre 20 a 55% das cepas ExPECs são resistentes a antibióticos como as cefalosporinas, fluoroquinolonas, e sulfametoxazol-trimetoprima. Este problema tem ocasionado falhas graves para o início da terapia antibiótica apropriada, o que sugere a relação

com o aumento da mortalidade de pacientes (PITOU 2012a; 2012b; SHEPHERD; POTTINGER, 2013).

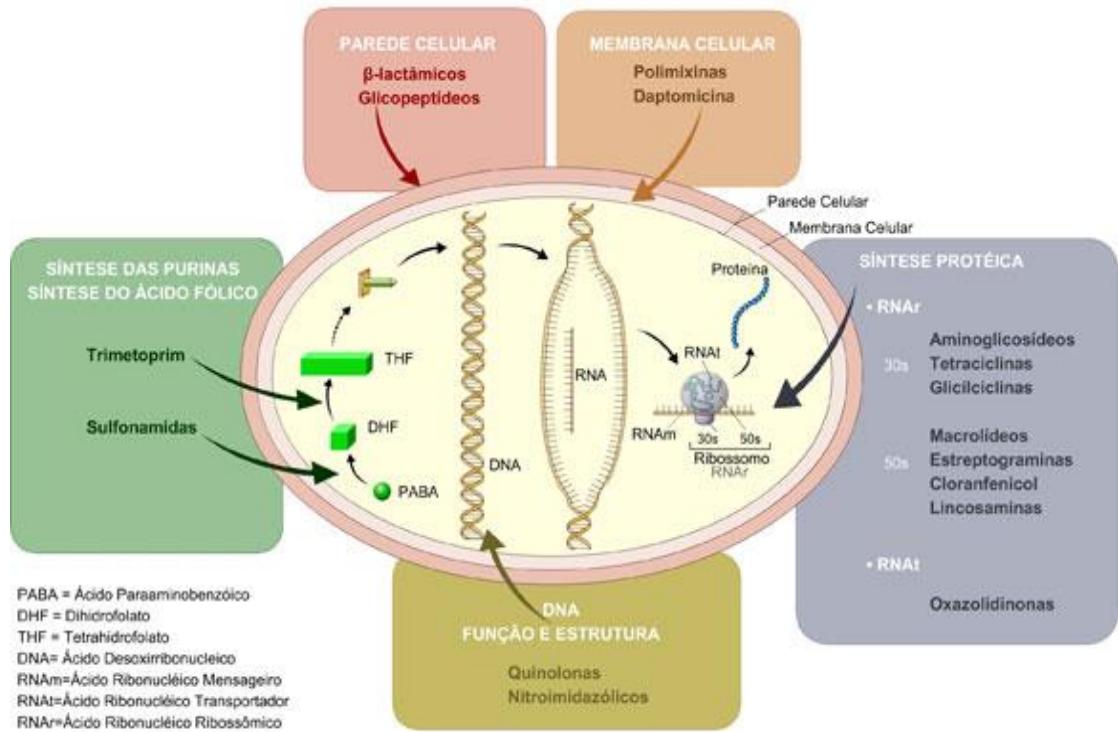
As fluorquinolonas são drogas bactericidas sintéticas com ampla atividade antimicrobiana, tendo como principal representante para o tratamento de enterobactérias gram-negativas a ciprofloxacina, a ofloxacina e a lomefloxacina. Em geral, são úteis no tratamento das ITUs, mas seu amplo espectro engloba, na maior parte, os microorganismos responsáveis pelas enterites bacterianas (GUO *et al.*, 2015).

O mecanismo de ação das fluorquinolonas constitui na interferência do superenrolamento do DNA através da inibição da DNA girase (também denominada topoisomerase II), a enzima que produz superespiralamento negativo no DNA (MITSCHER, 2005; RANG *et al.*, 2015). Pesquisas têm demonstrado uma tendência preocupante na resistência de *E.coli* a fluoroquinolonas devido à produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), com aumento constante nas últimas décadas (NICOLAS-CHANOINE; BERTRAND; MADEC, 2014; STAPLETON; WAGENLEHNER; MULGIRIGAMA; TWYNHOLM, 2020).

Um estudo realizado com isolados de *E. coli* ST131 encontrou um elevado volume de β -lactamases de espectro estendido, quase todas são resistentes às fluoroquinolonas. A disseminação mundial das cepas *E.coli* ST131 representa um verdadeiro problema de saúde pública, devido sua patogenicidade, o espectro de infecções que causam e o grande número de genes associados à virulência (COLPAN *et al.*, 2013; STAPLETON; WAGENLEHNER; MULGIRIGAMA; TWYNHOLM, 2020).

O sulfametoxazol, pertencente ao grupo das sulfonamidas, têm efeito bacteriostático e é comumente empregado em associação com o trimetoprima, uma diamino-pirimidina, associação mais conhecida como cotrimoxazol. O efeito das duas drogas é sinérgico e atuam na inibição da síntese do ácido tetra-hidrofólico (ácido folínico), necessária para a síntese dos ácidos nucléicos (Figura 5) (BRASIL, 2007).

Figura 5. Classificação dos antibióticos e mecanismo de ação.



Fonte: BRASIL, 2007.

Sulfonamidas e trimetoprima possuem um amplo espectro antibacteriano que abrange, além da *Escherichia coli*, outros membros da família *Enterobacteriaceae*, incluindo patógenos gastrointestinais, como espécies de *Shigella*. São amplamente utilizados para o tratamento das infecções do trato urinário, altas e baixas, uretrites e prostáticas agudas ou crônicas. No entanto, o aumento na resistência bacteriana tem limitado seu uso empírico nas infecções graves (ELIOPoulos; HUOVINEN, 2001; PITOUT; NORDMANN; LAUPLAND; POIREL, 2005; BRASIL, 2007).

A resistência bacteriana a esses agentes tem sido associada a falhas no tratamento, resultando em alterações de diferentes enzimas de substrato ou de sua superprodução, perda da capacidade bacteriana de ligação ao fármaco e diminuição da permeabilidade celular. Estudos têm demonstrado o aumento da resistência associada a sulfametoxazol/ trimetoprima entre *E. coli* produtoras de CTX-M. Essas cepas também apresentaram resistência a outros importantes medicamentos como tetraciclina, gentamicina, tobramicina e ciprofloxacina (PITOUT; NORDMANN; LAUPLAND; POIREL, 2005; GUNEYSEL; ONUR; ERDEDE; DENIZBASI, 2009).

A diminuição gradual do uso desses agentes terapêuticos para o tratamento de infecções por *Escherichia coli* e o surgimento de outros importantes microrganismos patogênicos nas

últimas décadas suscita a importância de pesquisas com foco no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos mais eficazes e seguros (ELIOPOULOS; HUOVINEN, 2001).

2.4 Compostos orgânicos sintéticos

As primeiras descobertas acerca da química sintética nasceram no século XVIII, a partir dos trabalhos de boticários, entre os quais, destacam-se as experiências de Carl Wilhelm Scheele que, além de identificar a molécula de oxigênio, descobriu vários ácidos orgânicos de ocorrência natural, como os ácidos cítrico, gálico, málico, lático e úrico. Desde então, esse ramo da química se tornou fundamental para os estudos de inovação científica em diferentes áreas da ciência e forneceu bases sólidas para o surgimento da síntese orgânica (NICOLAOU, 2013; 2014).

O primeiro produto natural a ser sintetizado em laboratório foi a ureia, no início do século XIX, pelo químico alemão Fredrich Wohler. Este importante evento foi determinante para os primeiros passos do homem no desenvolvimento de compostos orgânicos em laboratório sem estudos *in vivo* e o marco do nascimento da síntese total, a subdisciplina da síntese orgânica (NICOLAOU, 2014). Desde então, muitos produtos químicos orgânicos sintéticos vêm sendo produzidos e usados em grandes quantidades em todo o mundo para diferentes fins (KOELLER; WONG, 2001; COLEY et al., 2019).

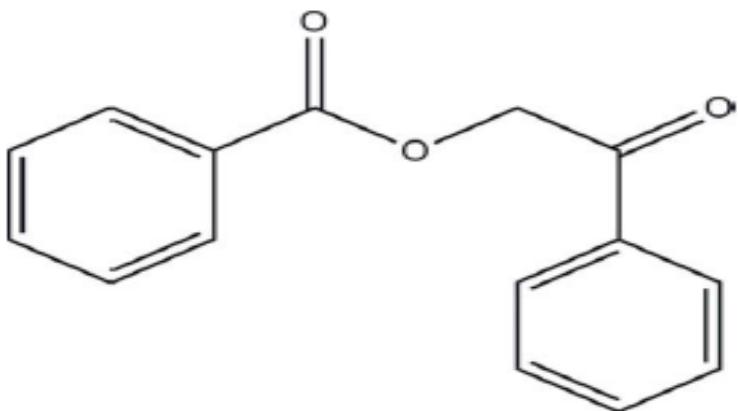
Os compostos orgânicos sintéticos são produzidos através da síntese química, processo de produção de uma substância através de uma ou mais reações químicas controladas. A síntese química de compostos orgânicos se utiliza da aplicação de tecnologias sofisticadas (COLEY et al., 2019) e tem facilitado o desenvolvimento de muitas áreas da ciência e tecnologia, especialmente, a indústria farmacêutica, auxiliando-a na descoberta de muitas terapias revolucionárias que melhoraram, significativamente, a saúde humana (NICOLAOU, 2014; KWONG et al., 2017; CAMPOS et al., 2019).

Fatores como o custo da síntese, a disponibilidade de reagentes, o nível de complexidade das transformações sintéticas e os aspectos de segurança para as reações químicas têm contribuído para que esse método seja cada vez mais utilizado em todo o mundo. A síntese química de compostos orgânicos oportunizou descobertas e o desenvolvimento de novas moléculas com funções que buscam atender necessidades específicas e constitui uma relevante

ferramenta para a produção de novos medicamentos (KWONG et al., 2017; CAMPOS et al., 2019).

Nesta perspectiva, destaca-se a molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato, também conhecida como benzoato de fenacila, é utilizada na química sintética em diferentes aplicações, a exemplo da síntese de compostos oxazólicos, imidazólicos e benzoxazólicos (HUANG et al., 1996; GANDHI et al., 1995). Em química orgânica, o benzoato de fenacila é formado pela reação química entre o ácido e o brometo de fenacila, representado pela fórmula molecular C₁₇H₁₆O₃ e com estrutura química molecular conforme a figura 6 (FUN et al., 2011).

Figura 6. Estrutura molecular de 2-oxo-2-feniletil benzoato.



Fonte: FUN et al., 2011.

A molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato desempenha um papel fundamental como grupo de proteção para ácidos carboxílicos em síntese orgânica e bioquímica. Os derivados de brometo de fenacila, cada vez mais utilizados no campo da química sintética, possuem diversas vantagens, entre elas, a capacidade de serem facilmente clivados em condições completamente neutras e suaves e, portanto, usados para a identificação de ácidos orgânicos (RUZICKA; ZABADAL; KLÁN, 2002; LITERÁK; DOSTÁLOVÁ; KLÁN, 2006; KUMAR et al., 2016).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ✓ Investigar a atividade antibacteriana *in vitro* da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato frente à linhagens patogênicas de *Escherichia coli* de origem hospitalar.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato sobre cepa ATCC (*American Type Culture Collection*) e linhagens de *E.coli* de origem hospitalar;
- ✓ Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato sobre cepa ATCC (*American Type Culture Collection*) linhagens de *E.coli* de origem hospitalar;
- ✓ Avaliar os resultados da associação de 2-oxo-2-feniletil benzoato com o antibacteriano padrão através do método de *Checkerboard*.

Materiais e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de pesquisa

Os ensaios de investigação de atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Pesquisas de Atividade Antibacteriana e Antifúngica, situado no Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, vinculado ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Ativos, sob coordenação da Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima.

4.2 Linhagens bacterianas

Para os ensaios de atividade antibacteriana foram utilizadas 15 linhagens de *Escherichia coli* cedidas pela farmacêutica-bioquímica Albalucia Maria da Costa Carvalho, obtidas de amostras clínicas do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário Lauro Wanderley, da Universidade Federal da Paraíba, localizado em João Pessoa – PB.

Além das linhagens de origem clínica, para os ensaios de atividade antibacteriana, foi utilizada cepa padrão oriunda de American Type Culture Collection (ATCC-25922). Todas as amostras bacterianas foram mantidas em meio BHI, à temperatura de 4 °C e realizados repiques com intervalos de 24-48 horas, também no meio de cultura BHI, conforme as instruções do fabricante.

Tabela 1. Linhagens bacterianas da Escherichia Coli e origem.

Linhagens	Origem
E.C – 09	Urina
E.C – 13	Urina
E.C - 704	Urina
E.C – 705	Urina
E.C – 706	Urina
E.C – 713	Urina
E.C – 773	Urina
E.C – 774	Urina
E.C – 780	Urina
E.C – 807	Urina
E.C – 883	Urina
E.C – 891	Urina
E.C – 908	Urina
E.C – 931	Urina
E.C – 947	Urina

4.3 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado nos ensaios para avaliação da atividade biológica foi Brain Heart Infusion (BHI), adquirido da DIFCO Laboratories LTDA, USA/France, o qual foi solubilizado com água destilada e esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos, conforme instruções do fabricante.

4.4 Inóculo

Para a preparação do inóculo, linhagens de *Escherichia coli* foram semeadas em meio BHI, incubadas a uma temperatura de 35±2 °C, por um período de 24/48 horas. Posteriormente, colônias obtidas a partir dessas culturas foram suspensas em solução de cloreto de sódio 0,9% (Nacl) estéril e ajustadas conforme o padrão de McFarland (1,5x10⁶ UFC/mL) (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000).

4.5 Molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato e antibacterianos-padrões

A molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato foi sintetizada e cedida pelo Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS) vinculado ao Departamento de Química do Centro de Ciências de Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba (CCEN/UFPB). Tal molécula foi submetida aos ensaios biológicos para avaliação da atividade antimicrobiana

frente à linhagens de *E. coli*. Os antibacterianos-padrões utilizados nos ensaios como controles foram Imipeném e Cefepime, ambos adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®.

4.6 Métodos

4.6.1 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

4.6.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Por definição, CIM é a menor concentração da (s) substância (s) testada (s) que inibe, visualmente, o crescimento bacteriano. Para determinação da CIM da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato frente à linhagen bacterianas de *E. coli*, foi realizada a técnica de microdiluição em caldo utilizando placas de 96 cavidades com fundo em formato de “U” em triplicata, conforme protocolo descrito por Cleeland e Squires (1991), CLSI (2008), Hadacek e Greger (2000) e Moreira (2010).

Inicialmente, em cada orifício da microplaca, foram adicionados 100 µL de meio líquido BHI, duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL solubilizados da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato foram adicionados nos poços da primeira linha das placas de microdiluição. E, por meio de uma diluição seriada à razão de dois, foram obtidas concentrações de **1024 a 0,5 µg/mL**. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo das bactérias nas cavidades onde, cada coluna da placa refere-se, especificamente, à uma linhagem de *E. coli*. Paralelamente, foram realizados os controles: micro-organismo (caldo + bactéria), para comprovação da viabilidade das linhagens bacterianas utilizadas no estudo, meio de cultura (BHI), para garantia da esterilidade do meio de cultura e controle com Cefepime e Imepenem, para comprovação da atividade antibacteriana. As placas preparadas foram assepticamente fechadas, seladas e incubadas na temperatura de 35 ± 2 °C por um período de 24-48h, decorrido esse período foi feita a leitura dos ensaios biológicos. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos pela média aritmética obtidas a partir dos mesmos.

A molécula testada foi considerada ativa quando inibiu, pelo menos, 50% dos micro-organismos utilizados nos ensaios de atividade biológica (CLEELAND E SQUIRES, 1991; HAFIDH et al., 2011). E a Concentração Inibitória Mínima /CIM, foi considerada e interpretada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até 500 µg/mL= forte atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

4.6.1.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

De posse dos resultados da CIM, foram retiradas alíquotas de 10 µL do sobrenadante das cavidades em que se observou completa inibição do crescimento bacteriano (CIM, CIMx2 e CIMx4) para semear em placas de microdiluição contendo 100 µL de caldo BHI, sendo posteriormente incubadas por 24/48 horas a 35±2°C. A CBM foi considerada como a menor concentração da molécula teste capaz de matar 99% do inóculo (crescimento inferior a 3 colônias bacterianas) das linhagens de *E. coli*. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CBM's obtidas nos três ensaios (NCUBE; AFOLAYAN, OKOH, 2008; BALOUIRI et al., 2016). Paralelamente, foi realizado o controle de esterilidade (caldo BHI) e de viabilidade das linhagens bacterianas (caldo BHI mais inóculo de cada micro-organismo).

Também foi avaliado o modo de ação da molécula teste através da razão CBM/CIM, metodologia esta utilizada por Siddiqui et al. (2013) para especificar a natureza do efeito antimicrobiano, considerada como bactericida quando a razão CBM/CIM for ≤ 4 e, bacteriostática quando esta for > 4 .

4.6.1.3 Ensaio de associação através do método checkerboard

O efeito de associação do produto com antibacterianos padrões foi determinado a partir do método de *Checkerboard* para derivação do ICIF (Índice da concentração inibitória fracionada), conforme protocolo descrito por Odds (2003). Tal método é definido como um teste de microdiluição que avalia a CIM de drogas sozinhas e combinadas. A partir do ICIF, são realizados os cálculos para avaliar se a associação resultou em sinergismo, antagonismo ou indiferença.

Para realização deste ensaio, foram utilizadas soluções dos produtos testados em concentrações determinadas a partir de suas respectivas CIM. Inicialmente, 100µL de caldo BHI foram adicionados nos poços de microplacas estéreis contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” (Alamar®). Em seguida, 50 µL de diferentes concentrações CIM÷4, CIM÷2, CIM, CIM×2, CIM×4 e CIM×8) do composto 2-oxo-2-feniletil benzoato e dos antibacterianos-padrões foram adicionados no sentido vertical (antibacterianos-padrões) e horizontal (2-oxo-2-feniletil benzoato) da microplaca. Por fim, adicionou-se 10 µL dos inóculos bacterianos. As placas

foram então seladas e incubadas a $35\pm2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para realização da leitura. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos pela média aritmética obtidas nos três ensaios. (ELIOPOULOS; MOELLERLING, 1991; DUTTA et al., 2004).

O ICIF foi calculado a partir da soma das concentrações inibitórias fracionadas (CIFs): CIF_A + CIF_B onde, A representa o 2-oxo-2-feniletil benzoato e B o antibacteriano-padrão. O CIF_A, por sua vez, é calculado através da relação CIMA combinado/CIMA isolado, enquanto que o CIF_B = CIMB combinado/CIMB sozinho (ODDS, 2003). Este índice é interpretado da seguinte forma:

- Sinergismo: $\text{ICIF} \leq 0,5$
- Antagonismo: $\text{ICIF} > 4,0$
- Indiferença: $0,5 < \text{ICIF} \leq 4$

Resultados e discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da 2-oxo-2-feniletil benzoato

A Tabela 2 apresenta o resultado do ensaio das linhagens clínicas de *E. coli* e da cepa ATCC 25922 frente à molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato, e dos controles positivo e negativo, através da técnica de microdiluição.

Tabela 2. Média dos resultados da avaliação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato sobre cepas de *Escherichia coli*- Técnica de Microdiluição.

Micro-organismos	Molécula-teste ($\mu\text{g/mL}$)											Controles			
	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	Micro-organismo	Meio de cultura	CBM
09	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024
13	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024
704	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024
705	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
706	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024
713	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024
773	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024
774	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024
780	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
807	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
883	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
891	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024
908	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024
931	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024
947	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024
ATCC 25922	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024

(-): Não houve crescimento do micro-organismo

(+): Crescimento do micro-organismo

De acordo com a Tabela 2, a molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato, na concentração de 256 $\mu\text{g/mL}$, inibiu o crescimento de 8 dos micro-organismos utilizados nos ensaios biológicos,

caracterizando, dessa maneira, a sua CIM. Além disso, sua CBM ficou estabelecida em 1024 $\mu\text{g/mL}$.

Com posse desse valor de CIM, pode-se afirmar que a molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato apresenta um poder inibitório de crescimento contra as linhagens de *E. coli* ensaiadas considerado forte, pois, de acordo com o estudo de Sartoratto et al. (2004), a atividade antibacteriana de uma determinada substância pode ser classificada como forte quando o valor da CIM é estabelecido entre 50-500 $\mu\text{g/mL}$.

A inexistência de estudos na literatura científica que avaliem a atividade antibacteriana, a partir do método de microdiluição, dessa molécula sintética em estudo frente à essas mesmas linhagens clínicas de *E. coli* impossibilita a comparação de dados com outras pesquisas.

Contudo, é importante salientar que, com o crescente desenvolvimento da indústria química e farmacêutica, os compostos químicos sintetizados têm apresentado atividades farmacológicas notáveis. A exemplo disto, destacam-se os inúmeros compostos derivados do tiazol que, sintetizados por diferentes rotas, apresentam magnitudes variáveis de atividades biológicas. Ao longo dos anos, têm se observado importantes experiências mostrando que tais compostos possuem propriedades antitumoral, antidepressiva, antialérgica, antioxidante, antiviral, analgésica, antimicrobiana e antiinflamatória (ÖZDEMİR et al., 2007; BARBUCEANU et al., 2009; KARTHIKEYAN, 2009; SAROJINI et al., 2010; VERMA; MARTIN; SINGH, 2014; MISHRA et al., 2017).

No que se diz respeito à atividade antimicrobiana dos derivados dos tiázois, inúmeros estudos de avaliação farmacológica verificaram propriedades de moderada a forte atividade contra espécies bacterianas e fúngicas como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (ÖZDEMİR et al., 2007; BARBUCEANU et al., 2009; KARTHIKEYAN, 2009; SAROJINI et al., 2010).

Ozdemir et al. (2007) relatou a síntese de derivados de 1- (4-aryl-2-tiazolil) -5-aryl-2-pirazolina por reação de pirazolinas substituídas com brometo de fenacila em etanol. Os derivados sintetizados foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Aeromonas hydrophila*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*, tomando como indicador da atividade dos

compostos a zona de inibição medida com fluconazol. Seus resultados mostraram que todos os compostos sintetizados apresentaram forte atividade antimicrobiana (ÖZDEMİR et al., 2007).

Os sintéticos derivados de bifenil também compõe uma classe amplamente estudada e seus compostos têm exibido atividades farmacológicas promissoras, tais como antimicrobiana, antifúngica, antiproliferativa, antidiabética, imunossupressora, analgésica e antiinflamatória. Embora possa ser encontrado facilmente na natureza, o bifenil pode ser produzido sinteticamente usando diferentes métodos (DEEP et al., 2010; JAIN; GIDE; KANKATE, 2017).

Deep et al (2010) sintetizaram derivados da hidrazida-hidrazone do ácido bifenil-4-carboxílico e utilizou-os para avaliar a sua atividade antimicrobiana *in vitro* contra quatro cepas bacterianas, sendo duas Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e duas Gram positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e cepas de fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. O estudo mostrou que todos os compostos exibiram resultados satisfatórios (DEEP et al., 2010).

Outras pesquisas têm se concentrado na avaliação da atividade farmacológica dos análogos sintéticos e compostos da classe neolignanas. Os neolignanos de ocorrência natural possuem fontes limitadas, no entanto, extensa diversidade de bioatividade que vão desde propriedades antioxidantes, antivirais, antiinflamatórias até antitumorais. Diante disso, uma série de estudos com derivados sintéticos dos neolignans vem sendo conduzida (TEPONNO; KUSARI; SPITELLER, 2016; DE CASTRO OLIVEIRA et al., 2017; FUKUI et al., 2018).

Adicionalmente, a atividade antibacteriana de uma substância também pode ser caracterizada de acordo com sua natureza bacteriostática ou bactericida e esta informação é obtida através do cálculo da razão entre CBM/CIM. De acordo com Siddiqui et al. (2013), o efeito bactericida é considerado quando a razão entre CBM/CIM for ≤ 4 , já o efeito bacteriostático precisa ter razão > 4 (SIDDQUI et al., 2013). O presente estudo determinou a razão CBM/CIM da 2-oxo-2-feniletil benzoato. Logo, verificou-se que a substância 2-oxo-2-feniletil benzoato possui natureza bactericida.

5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos antibacterianos padrões

Os resultados nas Tabelas 3 e 4 apresentam o comportamento das linhagens clínicas de *Escherichia coli* e da cepa ATCC 25922 diante dos antibacterianos já existentes no mercado: Imipeném e Cefepime, bem como os respectivos controles, utilizando a técnica de microdiluição.

Tabela 3. Média dos resultados da avaliação da CIM (µg/mL) do Imipeném contra cepas clínicas de *E. coli*- Técnica de Microdiluição.

Micro-organismos	Imipeném (µg/mL)										Controles		CBM		
	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	Micro-organismo	Meio de cultura	
09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	4
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	8
704	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
705	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
706	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
713	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
773	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
774	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	8
780	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	8
807	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	8
883	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
891	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	8
908	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
931	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	8
947	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	4
ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	8

(-): Não houve crescimento do micro-organismo

(+): Crescimento do micro-organismo

Como pode ser observado na Tabela acima, o antibacteriano-padrão Imipeném apresentou atividade antibacteriana frente à 100% dos micro-organismos testados, tendo sua CIM estabelecida em 2 µg/mL, igual a CIM estabelecida pela BrCAST-EUCAST (2017), e CBM não superior à 8 µg/mL.

Tabela 4. Média dos resultados da avaliação da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do Cefepime frente à linhagens clínicas de *E. coli*- Técnica de Microdiluição.

Micro-organismos	Cefepime ($\mu\text{g/mL}$)										Controles				
	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	Micro-organismo	Meio de cultura	CBM
09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	256
13	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
704	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
705	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024
706	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	512
713	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
773	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
774	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	256
780	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	256
807	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	512
883	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
891	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
908	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
931	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	256
947	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
ATCC 25922	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1024

(-): Não houve crescimento do micro-organismo

(+): Crescimento do micro-organismo

De acordo com a tabela acima, assim como o Imipeném, o Cefepime também foi capaz de inibir o crescimento de todas as linhagens clínicas de *Escherichia coli* testadas e da cepa ATCC 25922 porém, suas CIM e CBM foram estabelecidas em 256 $\mu\text{g/mL}$. Vale salientar que esse valor de CIM difere do valor estabelecido pela BrCAST-EUCAST (2017), que é 1 $\mu\text{g/mL}$ e que sua CBM foi a mesma estabelecida para a molécula-teste.

Nas tabelas 3 e 4, verifica-se também que, nos controles, todas as bactérias testadas cresceram em caldo BHI, sem adição do antibiótico-padrão, o que caracteriza a viabilidade dos micro-organismos. Da mesma forma um controle de esterilidade foi realizado e, não houve crescimento bacteriano no caldo BHI utilizado nos ensaios, portanto, certificou-se que o mesmo não estava contaminado.

5.3 Ensaio de associação através do método *Checkerboard*

A identificação de produtos de origem natural e/ou sintéticos com atividade antibacteriana isolada ou em combinação com antibióticos já disponíveis no mercado, podem representar promissora alternativa de tratamento, potencializa-los ou até mesmo agregar benefícios como diminuição de reações adversas, diminuir a dose do fármaco e aumentar o espectro de ação (COUTINHO, 2008).

O resultado da associação entre a molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato e o antibacteriano padrão Imipeném frente à linhagem clínica de *Escherichia coli* e a cepa ATCC-25922, avaliados pelo método *Checkerboard* estão demonstrados na tabela abaixo:

Tabela 5. Resultados da avaliação da Técnica de *Checkerboard*.

Micro-organismos	CIF _A	CIF _B	ICIF	Tipo de interação
	2-oxo-2-feniletil benzoato	Imipeném		
ATCC 25922	0,125	2	2,125	Indiferença
E.C 706	0,125	1	1,125	Indiferença

ICIF: Índice de concentração inibitória fracionada; CIF: Concentração inibitória fracionada.

Conforme os resultados expressos, a associação do Imipeném com a molécula-teste frente à cepa ATCC-25922 mostra um efeito do tipo antagonista e para a linhagem E.C 706 o efeito foi do tipo indiferente.

Uma combinação indiferente entre os tratamentos ocorre quando seu efeito conjunto for igual ao efeito de qualquer um dos agentes individuais. Já uma combinação de tratamento com efeito antagonista surge quando uma atividade reduzida é observada em relação ao efeito do constituinte individual mais eficiente (RAKHOLIYA; KANERIA; CHANDA, 2013). Sendo assim, a associação da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato com o antibiótico padrão Imipeném resultou em uma menor atividade antibacteriana frente à cepa ATCC 25922, no entanto, frente à linhagem E.C 706, percebeu-se que a molécula-teste não teve seu efeito antibacteriano potencializado, nem tão pouco diminuído, quando associada ao antibiótico-padrão.

Esses efeitos foram quantificados pela aplicação do cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), que tem direcionado muitos estudos sobre atividade antimicrobiana com o objetivo de identificar interações sinérgicas com drogas antimicrobianas, fornecendo

importantes evidências de compostos bioativos que podem ser explorados em terapias combinadas (ODDS, 2003; RAKHOLIYA; KANERIA; CHANDA, 2013).

A terapia combinada têm se mostrado eficaz em diferentes tratamentos, podendo resultar em eficácia melhorada, espectro aumentado da atividade antimicrobiana, prevenção da falha do tratamento e do desenvolvimento de resistência, diminuição na toxicidade relacionada à dose fixa em tratamentos com fármaco único, baixos custos e maior eliminação antimicrobiana ou inibição do crescimento em comparação com a monoterapia (SHENFIELD, 1982; RAKHOLIYA; KANERIA; CHANDA, 2013; CRYSTAL et al., 2014; WEBSTER, 2016)

Por isso, à medida que novos compostos antimicrobianos são descobertos, justifica-se a necessidade de avaliar seu potencial em terapias de combinação com outros antibióticos, mesmo quando for evidente que tais compostos não são diretamente inibidores, visto que com o desenvolvimento de cepas resistentes, antigos medicamentos usados no tratamento de doenças têm se tornado ineficaz, mas em uso combinado podem oferecer benefícios (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Os experimentos de Keawchai et al., (2021) utilizaram ampicilina combinada com dihidrobenzofurano neolignans contra *E. coli* ATCC 25922 e mostrou uma boa zona de inibição, melhor do que a ampicilina. Os resultados indicam boa eficácia antibacteriana, com redução de até 128 vezes da dose efetiva de ampicilina quando associada ao dihidrobenzofurano neolignans, no entanto, o neolignans isolado não teve atividade antibacteriana (KEAWCHAI et al., 2021).

Além disso, é importante salientar que as manifestações das doenças podem ocorrer por diversos fatores, como idade, tipo de tecido, órgão e estímulos ambientais. Sendo assim, a terapia combinada pode interagir em distintos alvos relacionados à patogênese da doença, direcionando simultaneamente diferentes proteínas ou vias de sinalização, por isso tem sido cada vez mais utilizada quando os esforços anteriores usando drogas únicas falharam em produzir uma terapêutica eficaz (SUN; SANDERSON; ZHENG, 2016).

Apesar da escassez de dados para a atividade antibacteriana da molécula teste associada à antibacteriano-padrão frente à linhagens de *E. coli*, os resultados se mostram promissores, uma vez que, frente à linhagem clínica e cepa de *E. coli*, a associação da molécula teste com não apresentou antagonismo, o que seria um efeito indesejável.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Com base nos ensaios de atividade antibacteriana realizados com a substância sintética 2-oxo-2-feniletil benzoato frente à linhagens clínicas de *E.coli* foi observado que:

A 2-oxo-2-feniletil benzoato apresentou atividade antibacteriana frente à linhagens clínicas de *E.coli* com CIM de 256 µg/mL e CBM de 1024 µg/mL.

O estudo demonstrou ainda que a associação da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato com Imipeném apresentou efeito de indiferença tanto para linhagem clínica E.C 706 quanto para cepa ATCC-25922.

Dessa maneira, reforça-se a necessidade de novos estudos com estratégias, abordagens e tecnologias inovadoras, de modo a elucidar e detalhar por outras vias metodológicas as potencialidades farmacológicas da molécula 2-oxo-2-feniletil benzoato, contribuindo para descoberta de um novo candidato à fármaco.

Referências

REFERÊNCIAS

- AGABA, P.; TUMUKUNDE, J.; TINDIMWEBWA, J. V. B.; KWIZERA, A. Nosocomial bacterial infections and their antimicrobial susceptibility patterns among patients in Ugandan intensive care units: a cross sectional study. **BMC Research Notes**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-12, 28 jul. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-017-2695-5>.
- BALOIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177915300150>.
- BARBUCEANU, S. F.; ALMAJAN, G. L.; SARAMET, I.; DRAGHICI, C.; TARCOMNICU, A. I.; BANCESCU, G. S., characterization and evaluation of antibacterial activity of some thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazole incorporating diphenylsulfone moieties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 44, n. 11, p. 4752-4757, nov. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.06.021>.
- BARON, S. ed. Microbiologia Médica. 4^a edição. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch em Galveston; 1996. Capítulo 4: JURTSCHUK, P. J. **Bacterial Metabolism**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7919/>.
- BARROS, R.P.C. **Identificação de linhagens de *Candida* sp. e perfil de sensibilidade a antifúngicos convencionais e de origem vegetal**. 2014. 81 f. TCC (Monografia apresentada ao curso de Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, 2014.
- BONTEN, M.; JOHNSON, J. R; BIGGELAAR, A. H. J. V. D.; GEORGALIS, L.; GEURTSEN, J.; PALACIOS, P. I.; GRAVENSTEIN, S.; VERSTRAETEN, T.; HERMANS, P.; POOLMAN, J. T. Epidemiology of Escherichia coli Bacteremia: a systematic literature review. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 72, n. 7, p. 1211-1219, 14 maio 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa210>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos - Bases teóricas e uso clínico**. Brasília: 2007. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosauda/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/quinilonas.htm. Acesso em: 12 ago. 2021.
- BRASIL. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- European Committee on Antibiotic Susceptibility**, Brasília: 2017. Disponível em: <http://brcast.org.br/tabela-pontos-de-corte-clinicos-BrCAST-2017-final.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2021.
- BURTON, G.R.W.; ENGELKIRK, P.G. **Microbiologia para as ciências da saúde**. 9^º edição. RJ: Guanabara Koogan, 2012.
- CAMPOS, K. R.; COLEMAN, P. J.; ALVAREZ, J. C.; DREHER, S. D.; GARBACCIO, R. M.; TERRETT, N. K.; TILLYER, R. D.; TRUPPO, M. D.; PARMEE, E. R. The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. **Science**, [S.L.], v. 363, n. 6424, p. 08-05, 17 jan. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aat0805>.

CASSINI, A.; HÖGBERG, L. D.; PLACHOURAS, D.; QUATTROCCHI, A.; HOXHA, A.; SIMONSEN, G. S.; COLOMB-COTINAT, M.; KRETZSCHMAR, M.; DEVLEESSCHAUWER, B.; CECCHINI, M.. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 56-66, jan. 2019. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30605-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30605-4).

CASTANHEIRA, B.A.M.G. **Mecanismos de resistência a antibióticos**. 2013. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa-Portugal, 2013.

CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, M. J.; HRIMPENG, K.; PINTO, J.; PINTO, E.. Antifungal activity of the essential oil of Angelica major against Candida, Cryptococcus, Aspergillus and dermatophyte species. **Journal Of Natural Medicines**, [S.L.], v. 69, n. 2, p. 241-248, 10 jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-014-0884-2>.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al. Diseases and Organisms in Healthcare Settings| HAI| CDC. **Cdc. gov**, 2017.

CERF, O.; CARPENTIER, B.; SANDERS, P. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: “Resistance” has different meanings. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 247–254, 2010.

CLEELAND, R; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiotics in laboratory medicine**, v. 3, p. 739-787, 1991.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. **CLSI document M27-A3 and Supplement S n. 3**, 2008.

COLEY, C. W.; THOMAS, D. A.; LUMMISS, J. A. M.; JAWORSKI, J. N.; BREEN, C. P.; SCHULTZ, V.; HART, T.; FISHMAN, J. S.; ROGERS, L.; GAO, H.. A robotic platform for flow synthesis of organic compounds informed by AI planning. **Science**, [S.L.], v. 365, n. 6453, p. 15-66, 8 ago. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aax1566>.

COLPAN, A.; JOHNSTON, B.; PORTER, S.; CLABOTS, C.; ANWAY, R.; THAO, L.; KUSKOWSKI, M. A.; TCHESNOKOVA, V.; SOKURENKO, E. V.; JOHNSON, J. R. Escherichia coli Sequence Type 131 (ST131) Subclone H30 as an Emergent Multidrug-Resistant Pathogen Among US Veterans. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 57, n. 9, p. 1256-1265, 6 ago. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit503>.

COUTINHO, H. D. M. Avaliação da atividade antibacteriana e fotossensibilizante de produtos naturais da região do cariri cearense. 2008. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Departamento de Farmacologia**, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2008.

CRYSTAL, A. S.; SHAW, A. T.; SEQUIST, L. V.; FRIBOULET, L.; NIEDERST, M. J.; LOCKERMAN, E. L.; FRIAS, R. L.; GAINOR, J. F.; AMZALLAG, A.; GRENINGER, P.

Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. **Science**, [S.L.], v. 346, n. 6216, p. 1480-1486, 13 nov. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1254721>.

DAVGASUREN, B.; NYAM, S.; ALTANGEREL, T.; ISHDORJ, O.; AMARJARGAL, A.; CHOI, J. Y. Evaluation of the trends in the incidence of infectious diseases using the syndromic surveillance system, early warning and response unit, Mongolia, from 2009 to 2017: a retrospective descriptive multi-year analytical study. **BMC Infectious Diseases**, [S.L.], v. 19, n. 1, 9 ago. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-019-4362-z>.

DAVOUDI, A. R.; NAJAFI, N.; SHIRAZI, M. H.; AHANGARKANI, F. Frequency of bacterial agents isolated from patients with nosocomial infection in teaching hospitals of Mazandaran University of Medical Sciences in 2012. **Caspian journal of internal medicine**, v. 5, n. 4, p. 227, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4247487/>.

OLIVEIRA, L. G. C.; BRITO, L. M.; ALVES, M. M. M.; AMORIM, L. V.; SOBRINHO-JÖNIOR, E. P. C.; CARVALHO, C. E. S.; RODRIGUES, K. A. F.; ARCANJO, D. D. R.; CITÓ, A. G. L.; CARVALHO, F. A. A. In VitroEffects of the Neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran AgainstLeishmania Amazonensis. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S.L.], v. 120, n. 1, p. 52-58, 16 set. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/bcpt.12639>.

DEEP, A.; JAIN, S.; SHARMA, P. C.; VERMA, P.; KUMAR, M.; DORA, C. P. Design and biological evaluation of biphenyl-4-carboxylic acid hydrazide-hydrazone for antimicrobial activity. **Synthesis**, v. 182, p. 183OC, 2010. Disponível em: https://ptfarm.pl/pub/File/acta_pol_2010/3_2010/255-259.pdf.

DENAMUR, E.; CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; GORDON, D.. The population genetics of pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 37-54, 21 ago. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>.

DESVAUX, M.; DALMASSO, G.; BEYROUTHY, R.; BARNICH, N.; DELMAS, J.; BONNET, R. Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal Escherichia coli. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-2, 25 set. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>.

DIAS, M. T.; SANTOS, P. C. R. F.; OLIVEIRA, L. A. T.; MARIN, V. A. Avaliação da sensibilidade de cepas de Escherichia coli isoladas de mexilhões (Perna perna linnaeus, 1758) à antimicrobianos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n.2, p. 319-324, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/D5nXGjfJFpkrfjZ9qWFq9Nm/abstract/?lang=pt>.

DOELLE, H. W. **Bacterial metabolism**. Academic Press, 2014.

DORON, S.; GORBACH, S.L. Bacterial Infections: overview. **International Encyclopedia of Public Health**, [S.L.], p. 273-282, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-012373960-5.00596-7>.

DUTTA, N. K; DASTIDAR, S. G; KUMAR, A; MAZUMDAR, K; RAY, R; CHAKRABARTY, A. N. Antimycobacterial activity of the antiinflammatory agent diclofenac sodium, and its synergism with streptomycin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p.

316-323, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/BSyr48kYwcn6TnNDDn6PRrK/abstract/?lang=en>.

ELIOPOULOS, G. M.; HUOVINEN, P. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 32, n. 11, p. 1608-1614, 1 jun. 2001. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1086/320532>.

ELIOPOULOS, G. M; MOELLERING, R. C. Antimicrobial combinations. In: Lorian. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, p. 434-441, 1991.

FOXMAN, B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. **Infectious Disease Clinics**, v. 28, n. 1, p. 1-13, 2014. Disponível em: [https://www.id.theclinics.com/article/S0891-5520\(13\)00074-3/fulltext](https://www.id.theclinics.com/article/S0891-5520(13)00074-3/fulltext).

FUKUI, M. J.; DIAS, H. J.; SEVERIANO, M. E.; DE SOUZA, M. G. M.; DE OLIVEIRA, P. F.; AMBRÓSIO, S. R.; MARTINS, C. H. G.; TAVARES, D. C.; CROTTI, A. E. M. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Dihydrobenzofuran Neolignans. **Chemistryselect**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 1836-1839, 12 fev. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/slct.201703024>.

FUN, H. K.; ARSHAD, S.; GARUDACHARI, B.; ISLOOR, A. M.; SATYANARAYAN, M. N. 2-Oxo-2-phenylethyl benzoate. **Acta Crystallographica Section e Structure Reports Online**, [S.L.], v. 67, n. 6, p. 1528-1528, 25 maio 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1107/s1600536811018976>.

GANDHI, S. S.; BELL, K. L.; GIBSON, M. S. Synthetic routes to 1, 5-dihydro-5-oxo-4, 1-benzoxazepines and to 5-oxooxazolo [3, 2-a] quinolines. **Tetrahedron**, v. 51, n. 48, p. 13301-13308, 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004040209500880H>.

GREGERSEN, L. H.; BRYANT, D. A.; FRIGAARD, N. U. Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 116, 2011. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00116/full>.

GUNEYSEL, O.; ONUR, O.; ERDEDE, M.; DENIZBASI, A. Trimethoprim/Sulfamethoxazole Resistance in Urinary Tract Infections. **The Journal of Emergency Medicine**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 338-341, maio 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jemermed.2007.08.068>.

GUO, S.; WAKEHAM, D.; BROUWERS, H. J. M.; COBBOLD, R. N.; ABRAHAM, S.; MOLLINGER, J. L.; JOHNSON, J. R.; CHAPMAN, T. A.; GORDON, D. M.; BARRS, V. R. Human-associated fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clonal lineages, including ST354, isolated from canine feces and extraintestinal infections in Australia. **Microbes And Infection**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 266-274, abr. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2014.12.016>.

GUPTA, P. Poisonous foods and food poisonings. **Illustrated Toxicology**, [S.L.], p. 285-307, 2018. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-813213-5.00010-9>.

- HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical analysis**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000. Disponível em: [https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(200005/06\)11:3%3C137::AID-PCA514%3E3.0.CO;2-I](https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3%3C137::AID-PCA514%3E3.0.CO;2-I).
- HAFIDH, R. R; ABDULAMIR, A. S; VERN, L. S; BAKAR, F. A; ABAS, F; JAHANSIRI, F; SEKAWI, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 98-106, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3171003/>.
- HAVELAAR, A. H.; KIRK, M. D.; TORGERSON, P. R.; GIBB, H. J.; HALD, T.; LAKE, R. J.; PRAET, N.; BELLINGER, D. C.; SILVA, N. R. de; GARGOURI, N.. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. **Plos Medicine**, [S.L.], v. 12, n. 12, p. 1001-923, 3 dez. 2015. Public Library of Science (PLoS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>.
- HEIDARY, M.; MOMTAZ, H.; MADANI, M. Characterization of diarrheagenic antimicrobial resistant Escherichia coli isolated from pediatric patients in Tehran, Iran. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 16, n. 4, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4028759/>.
- HOCQUET, D.; MULLER, A.; BERTRAND, X.. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. **Journal of Hospital Infection**, v. 93, n. 4, p. 395-402, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195670116000645>.
- JAIN, Z. J.; GIDE, P. S.; KANKATE, R. S. Biphenyls and their derivatives as synthetically and pharmacologically important aromatic structural moieties. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2051-S2066, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535213002359>.
- JAYANTHI, A. Most common healthcare-associated infections: 25 bacteria, viruses causing HAIs. **Becker's hospital review**, 2014.
- KAPER, J.; NATARO, J.; MOBLEY, H. Pathogenic Escherichia coli. **Nat Rev Microbiol**, v2, p.123–140, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- KARTHIKEYAN, M. S. Synthesis, analgesic, anti-inflammatory and antimicrobial studies of 2, 4-dichloro-5-fluorophenyl containing thiazolotriazoles. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 2, p. 827-833, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.04.022>.
- KEAWCHAI, K.; CHUMKAEW, P.; PERMPOONPATTANA, P.; SRISAWAT, T. Synergistic effect of ampicillin and dihydrobenzofuran neolignans (myticaganal C) identified from the seeds of *Myristica fragrans* Houtt. against *Escherichia coli*. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 79, 2021. Disponível em: http://dx.doi.org/10.4103/japtr.japtr_85_20.

KLEPSER, M. E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M. A. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 42, n. 5, p. 1207-1212, maio 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aac.42.5.1207>.

KOELLER, K. M.; WONG, C. H. Enzymes for chemical synthesis. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 232-240, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35051706>.

KUMAR, C. S. C.; OOI, C. W.; VENKATACHALAPATHY, R.; CHANDRAJU, S.; QUAH, C. K.; FUN, H. Synthesis and crystal structure studies of amino derivatives of 4-chlorophenacyl benzoate. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 5, p. 295-301, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Chidan-Kumar-C-S/publication/303756031_Synthesis_and_crystal_structure_studies_of_amino_derivatives_of_4-chlorophenacyl_benzoate/links/5750fc9a08ae1f765f9465d4/Synthesis-and-crystal-structure-studies-of-amino-derivatives-of-4-chlorophenacyl-benzoate.pdf.

KUNIN, C. M.; LIU, YUNG-CHING. Excessive use of antibiotics in the community associated with delayed admission and masked diagnosis infectious diseases. **Journal Microbiology Immunology and Infection**, v.35, p. 141-146, 2002. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/12380785>.

KWONG, H. C.; KUMAR, C. S. C.; MAH, S. H.; CHIA, T. S.; QUAH, C. K.; LOH, Z. H.; CHANDRAJU, S.; LIM, G. K. Novel biphenyl ester derivatives as tyrosinase inhibitors: synthesis, crystallographic, spectral analysis and molecular docking studies. **Plos One**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 01701-17, 27 fev. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0170117>.

LAGIER, J. C.; EDOUARD, S.; PAGNIER, I.; MEDIANNIKOV, O.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 208-236, jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00110-14>.

LITERÁK, J.; DOSTÁLOVÁ, A.; KLÁN, P. Chain Mechanism in the Photocleavage of Phenacyl and Pyridacyl Esters in the Presence of Hydrogen Donors. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 713-723, 2006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo0521551>.

MICENKOVÁ, L.; BENOVÁ, A.; FRANKOVICOVÁ, L.; BOSÁK, J.; VRBA, M.; LEVCÍKOVÁ, A.; KMEŇOVÁ, M.; LMAJS, D. Human Escherichia coli isolates from hemocultures: septicemia linked to urogenital tract infections is caused by isolates harboring more virulence genes than bacteraemia linked to other conditions. **International Journal of Medical Microbiology**, [S.L.], v. 307, n. 3, p. 182-189, abr. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.02.003>.

MISHRA, R.; SHARMA, P. K.; VERMA, P. K.; TOMER, I.; MATHUR, G.; DHAKAD, P. K.. Biological Potential of Thiazole Derivatives of Synthetic Origin. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, [S.L.], v. 54, n. 4, p. 2103-2116, 7 mar. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jhet.2827>.

MITSCHER, L. A. Bacterial Topoisomerase Inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 105, n. 2, p. 559-592, 22 jan. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/cr030101q>.

MOHAMMED, A. S. H.; MUSSE, S. Y. M. Common Health Care Associated Infections. **Open Access Library Journal**, v. 7, n. 5, p. 1-9, 2020.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. G.; AMENDOEIRA, M. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 4. 2009. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/8661>.

MOMTAZ, H.; KARIMIAN, A.; MADANI; DEHKORDI, F. S.; RANJBAR, R.; SARSHAR, M.; SOUOD, N. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 8, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-12-8>.

MORA-RILLO, M.; FERNÁNDEZ-ROMERO, N.; FRANCISCO, C. N. S.; DÍEZ-SEBASTIÁN, J.; ROMERO-GÓMEZ, M. P.; FERNÁNDEZ, F. A.; LÓPEZ, J. R. A.; MINGORANCE, J. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. **Virulence**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 93-100, 2 jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4161/21505594.2014.991234>.

MOREIRA, A.C.P.; LIMA, E.O, WANDERLEY, P.A.; CARMO, E.S.; SOUZA, E.S. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n.1, p. 28-33, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/WKGRLWvGPRFqMsYzZmrX7pM/?lang=en>.

MUDD, S. Bacterial morphology as shown by the electron microscope: II. The bacterial cell-wall in the genus *Bacillus*. **Journal of bacteriology**, v. 42, n. 2, p. 251, 1941. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jb.42.2.251-264.1941>.

MUELLER, M.; TAINTER, C. R. *Escherichia Coli*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>.

MURRAY, P. R. **Microbiologia Médica**. 4^a ed. Elsevier, 2004.

NATARO, J.P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African journal of biotechnology**, v. 7, n. 12, 2008. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58804>.

NGUYEN, T.V.; LE, V.P.; LE, H.C.; GIA, K.N.; WEINTRAUB, A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 755-760, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.755-760.2005>.

NICOLAOU, K. C. Organic synthesis: the art and science of replicating the molecules of living nature and creating others like them in the laboratory. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 470, n. 2163, p. 20130690, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspa.2013.0690>.

NICOLAOU, K. C. The emergence of the structure of the molecule and the art of its synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 1, p. 131-146, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.201207081>.

NICOLAS-CHANOINE, M. H.; BERTRAND, X.; MADEC, J. Y. Escherichia coli ST131, an Intriguing Clonal Group. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 543-574, jul. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00125-13>.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3310682/>.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 1. 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/52/1/1/930000?login=true>.

ÖZDEMİR, A.; TURAN-ZITOUNI, G.; KAPLANCİKLİ, Z. A.; REVIAL, G.; GÜVEN, K. Synthesis and antimicrobial activity of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3-(2-thienyl)-5-aryl-2-pyrazoline derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 403-409, mar. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.10.001>.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 3, p. 1-9, 2012a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00009>.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 1165-1176, out. 2012b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1586/eri.12.110>.

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; LAUPLAND, K. B.; POIREL, Laurent. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 52-59, 25 maio 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki166>.

PORTER, J. R. A. V. L.: tercentenary of his discovery of bacteria. **Bacteriological reviews**, v. 40, n. 2, p. 260-269, 1976.

RAKHOLIYA, K. D.; KANERIA, M. J.; CHANDA, S. V. Medicinal Plants as Alternative Sources of Therapeutics against Multidrug-Resistant Pathogenic Microorganisms Based on Their Antimicrobial Potential and Synergistic Properties. **Fighting Multidrug Resistance With Herbal Extracts, Essential Oils And Their Components**, [S.L.], p. 165-179, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-398539-2.00011-2>.

RANJBAR, R.; MASOUDIMANESH, M.; DEHKORDI, F. S.; JONAIIDI-JAFARI, N.; RAHIMI, E. Shiga (Vero)-toxin producing *Escherichia coli* isolated from the hospital foods; virulence factors, o-serogroups and antimicrobial resistance properties. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-12, 7 jan. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13756-016-0163-y>.

REVELAS, A. Healthcare-associated infections: A public health problem. **Nigerian medical journal: journal of the Nigeria Medical Association**, v. 53, n. 2, p. 59, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3530249/>.

ROSER, M.; OCHMANN, S.; BEHRENS, H.; RITCHIE, H.; DADONAITE, B. Eradication of diseases. **Our World in Data**, 2014. Disponível em: <https://ourworldindata.org/eradication-of-diseases#citation>.

ROTH, G.; ABATE, D.; ABATE, K. H.; ABAY, S. M; ABBAFATI, C.; ABBASI, N.; ABBASTABAR, H.; ABD-ALLAH, F.; ABDELA, J.; ABDELALIM, A. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. **The Lancet**, [S.L.], v. 392, n. 10159, p. 1736-1788, nov. 2018. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)32203-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(18)32203-7).

RUZICKA, R.; ZABADAL, M.; KLÁN, P. Photolysis of phenacyl esters in a two-phase systém. **Synthetic communications**, v. 32, n. 16, p. 2581-2590, 2002. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/SCC-120005943>.

SAROJINI, B. K.; KRISHNA, B. G.; DARSHANRAJ, C. G.; BHARATH, B. R.; MANJUNATHA, H. Synthesis, characterization, in vitro and molecular docking studies of new 2,5-dichloro thienyl substituted thiazole derivatives for antimicrobial properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 45, n. 8, p. 3490-3496, ago. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.03.039>.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 275-280, dez. 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822004000300001>.

SHENFIELD, G. M. Fixed Combination Drug Therapy. **Drugs**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 462-480, jun. 1982. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2165/00003495-198223060-00003>.

SHEPHERD, A. K.; POTTINGER, P. S. Management of Urinary Tract Infections in the Era of Increasing Antimicrobial Resistance. **Medical Clinics Of North America**, [S.L.], v. 97, n. 4, p. 737-757, jul. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2013.03.006>.

SIDDQUI, Z. N.; FAROOQ, F.; MUSTHAFA, T.N. M.; AHMAD, A.; KHAN, A. U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 237-243, abr. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2011.03.016>.

SILVA, C. D. R.; SILVA JÚNIOR, M. Estratégias para uso adequado de antibioticoterapia em unidade de terapia intensiva. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 448-453, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eins/a/5pjH3bdKvqJ5x9TRvdbXB5Q/abstract/?lang=pt>.

SOKURENKO, E. V.; CHESNOKOVA, V.; DOYLE, R. J.; HASTY, D. L. Diversity of the *Escherichia coli* Type 1 Fimbrial Lectin. **Journal of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 272, n. 28, p. 17880-17886, jul. 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.28.17880>.

STAPLETON, A. E.; WAGENLEHNER, F. M. E.; MULGIRIGAMA, A.; TWYNHOLM, M. *Escherichia coli* Resistance to Fluoroquinolones in Community-Acquired Uncomplicated Urinary Tract Infection in Women: a systematic review. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.L.], v. 64, n. 10, set. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00862-20>.

STOKES, J. M.; LOPATKIN, A. J.; LOBRITZ, M. A.; COLLINS, J. J. Bacterial Metabolism and Antibiotic Efficacy. **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 251-259, ago. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2019.06.009>.

SUN, W.; SANDERSON, P. E.; ZHENG, W. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 21, n. 7, p. 1189-1195, jul. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.05.015>.

TENG, L.J.; HSUEH, P.R.; LIAW, S.J.; HO, S.W.; TSAI, J.C. Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. **Journal of Microbiology Immunology Infection**, v. 37, n. 6, p.327-334, 2004. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/15599464>

TEPONNO, R. B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. **Natural product reports**, v. 33, n. 9, p. 1044-1092, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C6NP00021E>

TOLERA, M.; ABATE, D.; DHERESA, M.; MARAMI, D. Bacterial Nosocomial Infections and Antimicrobial Susceptibility Pattern among Patients Admitted at Hiwot Fana Specialized University Hospital, Eastern Ethiopia. **Advances In Medicine**, [S.L.], v. 2018, p. 1-7, 4 dez. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/2127814>.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

TULCHINSKY, T. H.; VARAVIKOVA, E. A. Communicable Diseases. **The New Public Health**, [S.L.], p. 149-236, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-415766-8.00004-5>.

USEIN, C. R.; PAPAGHEORGHE, R.; OPREA, M.; CONDEI, M.; STRĂUŃ, M. Molecular characterization of bacteremic *Escherichia coli* isolates in Romania. **Folia Microbiologica**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 221-226, 9 out. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-015-0427-6>.

VERMA, A. K.; MARTIN, A.; SINGH, A. K.. Synthesis, Characterization and evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic activity of Benzothiazole derivatives. **Indian Journal of**

Pharmaceutical and Biological Research, v. 2, n. 03, p. 84-89, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.30750/ijpbr.2.3.14>.

VICENTINI, C. B.; ROMAGNOLI, C.; ANDREOTTI, E.; MARES, D. Synthetic Pyrazole Derivatives as Growth Inhibitors of Some Phytopathogenic Fungi. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], v. 55, n. 25, p. 10331-10338, dez. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jf072077d>.

VIHTA, K. D.; STOESSER, N.; LLEWELYN, M. J; QUAN, T P.; DAVIES, T.; FAWCETT, N. J; DUNN, L.; JEFFERY, K.; BUTLER, C. C; HAYWARD, G. Trends over time in Escherichia coli bloodstream infections, urinary tract infections, and antibiotic susceptibilities in Oxfordshire, UK, 1998–2016: a study of electronic health records. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 18, n. 10, p. 1138-1149, out. 2018. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30353-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30353-0).

VOUGA, M.; GREUB, G. Emerging bacterial pathogens: the past and beyond. **Clinical Microbiology and Infection**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 12-21, jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.010>.

WEBSTER, R. M. Combination therapies in oncology. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 81-82, fev. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.3>.

WILLIAMS, J. D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **Inter. J. Antimicrob. Agents**, v.12, p.3-7, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857999000850>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance. WHO**: Geneva, 2014. [Online]. Disponível em: <http://www.searo.who.int/thailand/factsheets/fs0023/en/>. Acesso em: 20 jul 2021.

ZHOU, X.; LI, Y. **Atlas of oral microbiology: From healthy microflora to disease**. Academic press, 2015.