



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GLEISON GONÇALVES FERREIRA

AÇÃO ANTIMICROBIANA E SINÉRGICA DAS CASCAS DE
***Geissospermum laeve* (VELL.) MIERS**

Belém - Pará
2025

GLEISON GONÇALVES FERREIRA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA E SINÉRGICA DAS CASCAS DE
Geissospermum laeve (VELL.) MIERS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e Avaliação de Medicamentos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Dr.^a Maria Fâni Dolabela.
Coorientadora: Dr.^a. Cintya de Oliveira Souza

Belém - Pará

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

- F383a Ferreira, Gleison Gonçalves.
 Ação antimicrobiana e sinérgica das cascas de
 Geissospermum laeve (Vell.) Miers / Gleison Gonçalves
 Ferreira. — 2025.
 110 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^a. Dra. Maria Fâni Dolabela
 Coorientação: Prof^a. Dra. Cintya de Oliveira Souza
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
 Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
 em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2025.
1. Geissospermum laeve. 2. Resistencia
 antimicrobiana. 3. Sinergismo. 4. Staphylococcus
 aureus. 5. Geissospermina. I. Título.

CDD 615

GLEISON GONÇALVES FERREIRA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA E SINÉRGICA DAS CASCAS DE
Geissospermum laeve (VELL.) MIERS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela (Orientadora)
Instituto de Ciências da Saúde (UFPA)

Profa. Dra. Cintya de Oliveira Souza (Coorientadora)
Instituto Evandro Chagas (Ministério da Saúde)

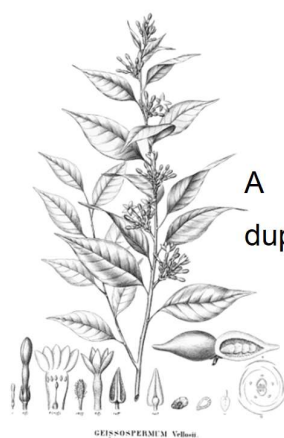
Profa. Dra. Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva (Interno)
Instituto de Ciências da Saúde (UFPA)

Dra. Silvia Helena Marques da Silva (Externo)
Instituto Evandro Chagas (Ministério da Saúde)

Belém - Pará

2025

DEDICATÓRIA



A Neuza, José, Cleiton e Gleiciane, vosso
duplo de tinta em papel.

AGRADECIMENTOS

Sem dúvida, a Deus, pela força, pelas vitórias, pela Vida.

Eu agradeço imensamente aos meus pais, Neuza Gonçalves e José Ferreira, por terem acreditado novamente no meu potencial e terem permitido continuação dos meus estudos – não basta entrar na Universidade é preciso ter os recursos para se manter. E eles fizeram o possível e impossível para que eu alcançasse esse sonho. Nunca conseguirei pagar tudo que fizeram/fazem por mim, meu irmão e minha irmã. Agradeço a minha madrinha, Francione Pensador, por estar presente em minha vida, se alegrando com cada vitória e acreditando que eu poderia tudo.

Agradeço ao meu irmão Cleiton Ferreira e a minha irmã Gleiciane Ferreira, por todo carinho, apoio e amor dedicados nesses anos de convivência. São décadas que aprendemos, brigamos, choramos, mas, acima de tudo, que nos amamos incondicionalmente, porque são sangue do meu sangue, carne da minha carne, amor do meu amor. Muito obrigado por estarem caminhando comigo, e, breve, nós receberemos as vitórias e o júbilo do nosso trabalho árduo.

Aos meus familiares, temos uma relação difícil, mas cheia de vitórias, amor, alegria. As minhas Avós Francisca (Vindica) Ferreira (*in memoriam*) e Maria Auxiliadora (*in memoriam*) por demonstrarem a força de uma família matriarcal, amo e amarei vocês para sempre!

Ao Carlos Brito, que há mais tempo caminha ao meu lado, meu melhor amigo, meu irmão, pelo carinho amoroso, pelas conversas, pelo amor, por me dar a honra de pertencer a sua família por meio do batismo da Lisandra, minha afilhada, meu muito obrigado por tudo. Ao Paulo Silva por toda troca intelectual, espiritual e emotiva, nascidos sob o mesmo signo, somos, pois, a representação deste, dois iguais diferentes que tem na amizade a expressão maior disso. Ao Luciano Barroso, por mais que hoje não atravessemos mais a vida um do outro, eu sempre serei eternamente grato por tudo, pelo amor, pelo carinho, pelos ensinamentos, pelas experiências, pelas sensações, pela afetividade sem igual que vivemos, meu irrestrito obrigado por tudo.

À Hanna Oeiras, minha dupla-PET por todo carinho, dedicação, aventuras e risos nesse caminho tão difícil no qual ela enfrentou provas terríveis, mas venceu todas, e hoje se dedica a ensinar e transformar vidas pela educação. Ao Daniel Queiroz, pelo respeito, carinho, inteligência, sagacidade e incrível capacidade de

mentir, mas para trazer alegria, só quem o conhece profundamente sabe o quão incrível esse menino e, boa sorte no seu caminho, um incrível farmacologista está a nascer. À Hanne Melo pelo ensinamento, pelo carinho, pela conexão, por me apresentar um mundo novo e por partir comigo *segredos de travesseiro*, obrigado pela confiança, carinho e respeito, minha futura médica, e quem vai me dar receitas quando necessário.

As amigas do laboratório e de vida Jessica Tomaz, Hanna Martins, Paulo Ricardo, Carolina Quaresma, Cristian Kallahan e Amanda Ramos, obrigado por ser mais que troca de conhecimentos, serem troca de afetos e alegrias. Por serem respeito e luz, vocês são profissionais incríveis e eu espero um dia ter um terço do conhecimento que vocês têm. E por fim, as meninas que atravessaram o meu caminho e me ajudaram a ter momentos mais leves e de felicidade, pois, acima de tudo, foram carinho e amor, mesmo eu nem sabendo se mereço... A Isis Kosmisky, Camilla Rolim, Ana Paula França, Paola Dantas, Eloise Cardoso, Sarah Viana e Marta Barbosa, meu muito obrigado!

As minhas queridas “alunas” de PET, Rayana Paz, Gabriela Bouças e Dandara Almeida, por me provocarem a todo dia com seus questionamentos e permitir o meu crescimento como pesquisador e orientador.

A minha querida orientadora, professora Maria Fâni Dolabela, por momentos alegres, recheados de discussões, provocações e ensinamentos! A “mãe” Dayse (Dayse Brandão) a senhora foi muito mais que uma amiga, mais que uma professora, a senhora foi uma educadora, uma mãe, muito, mais muito, obrigado! A querida Kelly Albuquerque pelas risadas, pelas trocas, pelas caronas, mas, principalmente pela troca humanizada de afetos e conhecimentos.

As professoras Cintya Souza e Marcia Bahia por terem aceitado essa coorientação e me ensinaram muito sobre o mundo da Microbiologia, pelas conversas alheias e pelas trocas infinitas de carinho e conhecimento e às meninas no Entero II: Tuane Moura, Beatriz e Emilly. Meu irrestrito obrigado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento dessa pesquisa.

A você que ler esta dissertação, na busca de encontrar alguma resposta para a dúvida que surge em sua cabeça, continue em seu caminho, pois ele pode ser árduo, mas trará grandes frutos!

EPIGRAFE

“Quando eu alçar o voo mais bonito da minha vida, quem me chamará de amor, de gostosa, de querida?

Que vai me esperar em casa, polir a joia rara
Ser o pseudofruto, a pele do caju...”

Liniker

Um subalterno é aquele que pertence “[...]às camadas mais baixas da sociedade constituídas pelos modos específicos de exclusão dos mercados, da representação política e legal, e da possibilidade de se tornarem membros plenos no estrato social dominante [...] Devemos agora confrontar a seguinte questão: no outro lado da divisão internacional do trabalho do capital socializado, dentro e fora do circuito da violência epistêmica da lei e da educação imperialistas, complementando um texto econômico anterior, pode o subalterno falar?[...]”

Gayatri Chakravorty Spivak

RESUMO

FERREIRA, Gleison Gonçalves. **Ação antimicrobiana e sinérgica das cascas de *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers**. 2024. 110p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará. 2025.

A resistência bacteriana é um fenômeno global que vem gerando inúmeros estudos com o objetivo de reverter o quadro alarmante, que pode levar a uma epidemia mundial. Estudos têm demonstrado que o extrato e as frações de *Geissospermum laeve* havendo uma carência de estudo sobre a ação de seus alcaloides. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o fracionamento do extrato de *G. laeve* impacta na atividade antibacteriana e no efeito sinérgico da associação com benzilpenicilina (BZP) e imipinem (IMP). O pó das cascas foi submetido à maceração exaustiva, obtendo-se o extrato (EEGL), sendo obtido a fração de alcaloide (FAGL) através da partição ácido: base. A caracterização química EEGL e FAGL foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O alcaloide foi obtido por partição ácido: base, com precipitação na basificação com hidróxido de amônia, foi então submetido a métodos cromatográficos e espectrométricos. A avaliação antimicrobiana foi realizada pelo método da microdiluição sendo determinada a concentração inibitória mínima (CIM), foram utilizadas cepas das coleções American Type Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (sensível) e ATCC 43300 (resistente a metilicina), e de *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensível) e o isolado clínico IEC 58932 (resistente). O efeito sinérgico foi avaliado pelo método do tabuleiro de xadrez. Os estudos *in silico* foram conduzidos nos servidores ADMETLab 3.0 e SwissADMET, com os alvos recuperados do servidor RCSB PDB e otimizados no APBS, sendo os resultados visualizados no Discovery Studio e PyMol. Análises em CLAE-DAD do EEGL e FAGL sugerem a presença de alcaloides indólicos e β -carbolínicos, bem como estudos realizados em RMN-H1 que possuem sinais sugestivos de alcaloide. Neste estudo foi isolado geissoschizolina (N4) metil cloro (GN4MC), foi confirmado por espectrometria de massa e RMN, com sinais característicos de hidrogênios e carbonos consistentes com a literatura. A análise por IR-TF corroborou a presença de grupos funcionais que estão presentes em alcaloides. Para as cepas de *S. aureus* a FAGL foi mais ativa que o EEGL, onde para a cepa sensível os CIMs obtidos foram de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente e para a resistente 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$, o GN4MC não demonstrou atividade. Para *E. coli* não houve atividade nas concentrações testadas. Apenas FAGL apresentou efeito sinérgico de potenciação quando associada BZP, para *S. aureus*, e ao IMP, para *E. coli*. Estudos *in silico* sugerem os alcaloides geissoschizina e geissoschizolina (N4) óxido destacam-se como candidatos promissores para o desenvolvimento de um novo antimicrobiano, por serem mais seletivos e menos tóxicos. Em síntese, a atividade antimicrobiana de *G. laeve* está relacionada aos alcaloides, distintos de GN4MC, podendo ser a geissoschizina ou geissoschizolina (N4) óxido. Esses alcaloides podem ser futuros adjuvantes farmacêuticos revertendo a formação do biofilme, além de apresentar atividade antimicrobiana intrínseca.

Palavras-chaves: *Geissospermum laeve*; Resistencia antimicrobiana; Sinergismo; *Staphylococcus aureus*; Geissospermina.

ABSTRACT

FERREIRA, Gleison Gonçalves. **Antimicrobial and synergistic action of *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers barks**. 2024. 110p. Dissertation (Master's degree) – Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Institute of Health Sciences, Federal University of Pará. 2025.

Bacterial resistance is a global phenomenon that has led to numerous studies aimed at reversing this alarming trend, which could potentially lead to a worldwide epidemic. Studies have shown that the extract and fractions of *Geissospermum laeve* have been investigated, though there is a lack of research on the action of its alkaloids. The objective of this study was to evaluate whether the fractionation of *G. laeve* extract impacts antibacterial activity and the synergistic effect when combined with Benzylpenicillin (BZP) and Imipenem (IMP). The bark powder was subjected to exhaustive maceration to obtain the crude extract (EEGL), and the alkaloid fraction (FAGL) was obtained through acid-base partitioning. The chemical characterization of EEGL and FAGL was performed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The alkaloid was obtained via acid-base partitioning, with precipitation upon basification using ammonium hydroxide, and was then subjected to chromatographic and spectrometric methods. Antimicrobial evaluation was conducted using the microdilution method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The strains used were from the American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (sensitive) and ATCC 43300 (methicillin-resistant), as well as *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensitive) and the clinical isolate IEC 58932 (resistant). The synergistic effect was assessed using the checkerboard method. In silico studies were conducted on the ADMETLab 3.0 and SwissADMET servers, with targets retrieved from the RCSB PDB server and optimized in APBS. The results were visualized using Discovery Studio and PyMOL. HPLC-DAD analyses of EEGL and FAGL suggest the presence of indole and β -carboline alkaloids, supported by $^1\text{H-NMR}$ studies showing signals indicative of alkaloids. In this study, geissoschizoline N4-methyl chloride (GN4MC) was isolated and confirmed by mass spectrometry and NMR, with characteristic hydrogen and carbon signals consistent with the literature. IR spectroscopy corroborated the presence of functional groups typical of alkaloids. For *S. aureus* strains, FAGL was more active than EEGL, with MICs of 50 $\mu\text{g/mL}$ and 200 $\mu\text{g/mL}$, respectively, for the sensitive strain, and 100 $\mu\text{g/mL}$ and 200 $\mu\text{g/mL}$ for the resistant strain. GN4MC showed no activity. For *E. coli*, no activity was observed at the tested concentrations. Only FAGL exhibited a potentiating synergistic effect when combined with BZP for *S. aureus* and with IMP for *E. coli*. In silico studies suggest that geissoschizine and geissoschizoline (N4) oxide stand out as promising candidates for the development of a new antimicrobial agent due to their higher selectivity and lower toxicity. In summary, the antimicrobial activity of *G. laeve* is related to alkaloids other than GN4MC, possibly geissoschizine or geissoschizoline (N4) oxide. These alkaloids may serve as future pharmaceutical adjuvants by reversing biofilm formation and exhibiting intrinsic antimicrobial activity.

Keywords: *Geissospermum laeve*; Antimicrobial Resistance; Synergism; *Staphylococcus aureus*; Geissospermine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Esquematização dos eventos de transferência de ARG	19
Figura 02	Representação icnográfica da formação do biofilme	25
Figura 03	Distribuição global da família Apocynaceae	32
Figura 04	Alguns alcaloides isolados do gênero <i>Geissospermum</i>	35
Figura 05	Esquema para obtenção do alcaloide isolado por meio de partição líquido-líquido	52
Figura 06	Esquema da placa de 96 poços para o TSAc	55
Figura 07	Esquema da placa de 96 poços para avaliação da atividade antimicrobiana	56
Figura 08	Esquema adotado para o método tabuleiro de xadrez (<i>checkerboard</i>)	57
Figura 09	Perfil em CCD do EEGL, FAGL e Isolado	60
Figura 10	Cromatogramas da FAGL e do isolado das cascas de <i>Geissospermum laeve</i> .	62
Figura 11	Espectro de massas de íon totais no modo positivo de ionização do isolado obtido das cascas de <i>G. laeve</i> .	63
Figura 12	Espectro de infravermelho obtido do composto isolado das cascas de <i>G. laeve</i>	64
Figura 13	Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do isolado obtido por partição	65
Figura 14	Estrutura obtida da Geissoschizolina (N4) metil cloro	67
Figura 15	Cepas semeadas no CHROMagar™ <i>Orientation</i> , apresentando colônias confluentes e puras, sem crescimento de colônias distintas	69
Figura 16	Inibição do crescimento em <i>S. aureus</i> (ATCC 6538) sem resistência, do extrato, fração de alcaloides e isolados das cascas de <i>G. laeve</i> .	70
Figura 17	Inibição do crescimento em MRSA (ATCC 43300), do extrato, fração de alcaloides e isolados das cascas de <i>G. laeve</i>	70
Figura 18	Ausência de inibição do crescimento em <i>E. coli</i> (ATCC 25922) sem resistência, do extrato, fração de alcaloides e isolados das cascas de <i>G. laeve</i>	71
Figura 19	Ausência de inibição do crescimento em <i>E. coli</i> (IEC-BAC 58932) coprodutora de NDM-KPC, do extrato, fração de alcaloides e isolados das cascas de <i>G. laeve</i>	72
Figura 20	Efeito sinérgico entre o EEGL, FAGL e a GN4MC com a benzilpenicilina frente a ATCC 43300 de MRSA	74

Figura 21	Ausência do efeito sinérgico do extrato frente cepa IEC-BAC 58932. Não sendo observado efeito fora do CIM do antibiótico	77
Figura 22	Alcaloides selecionados para a avaliação <i>in silico</i> encontrados nas cascas de <i>G. laeve</i>	81
Figura 23	Diagrama 2D das interações molecular entre a flavopereirina e seus alvos demonstrando suas interações	89
Figura 24	Diagrama 2D das interações molecular entre os alcaloides e seus alvos demonstrando suas interações	92

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 01	Metabólitos isolados de <i>Geissospermum laeve</i>	37
Quadro 02	Microrganismos utilizados nos ensaios biológicos	50
Quadro 03	Interações a partir do ICIF obtido	58
Tabela 01	Comparação entre os sinais de RMN de H ¹ e C ¹³ obtidos e com os encontrados na literatura	66
Tabela 02	Atividade anti-estafilocócica do extrato e da fração de <i>G. laeve</i>	69
Tabela 03	Efeito sinérgico do extrato, fração e isolado das cascas de <i>G. laeve</i> utilizando os antimicrobianos benzilpenicilina e Imipenem, através do índice de concentração inibitória fracionada (IFIC)	73
Tabela 04	Adesão das bactérias aos poços da placa de poliestireno para observação da produção de biofilme	78
Tabela 05	Predição físico-química dos alcaloides encontrados nas cascas de <i>G. laeve</i>	82
Tabela 06	Predição das propriedades farmacocinéticas dos compostos encontrados no espectro de CLAE-DAD, das cascas de <i>G. laeve</i> .	83
Tabela 07	Avaliação da ativação de receptores nuclear pelos alcaloides isolados da casca de <i>G. laeve</i>	86
Tabela 08	Predição da toxicidade dos alcaloides isolados de <i>G. laeve</i>	87
Tabela 09	Alvos moleculares em MRSA e sua interação com os alcaloides isolados de <i>G. laeve</i>	88
Tabela 10	Alvos moleculares em <i>E. coli</i> e sua interação com os alcaloides isolados de <i>G. laeve</i> .	90

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
cm ⁻¹	N° de bandas
cm	Centímetro
Kg	Kilograma
g	Grama
%	Porcentagem
H	Hora
L	Litro
mL	Mililitro
Min	Minuto
Nm	Nanometro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
δ	Deslocamento químico
H	Horas
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
ATCC	American Type culture collection
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ O	Água
NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
NaCl	Cloreto de Sódio
MeOH	Metanol
ACN	Acetonitrila
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme-linkedimmunosorbent
IV	Infravermelho
CTT	Cloreto de 2,3,4 trifenil tetrazólio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TR	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta
vis.	Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Resistência a antimicrobianos	18
2.1.1 ALTERAÇÃO DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À PENICILINAS (PBP)	21
2.1.2 PRODUÇÃO DE B-LACTAMASES	22
2.1.3 ALTERAÇÕES NA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA CELULAR	23
2.1.4 EFLUXO ATIVO DE ANTIBIÓTICOS	24
2.1.5 FORMAÇÃO DE BIOFILME	25
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (MRSA)	27
2.3 <i>Escherichia coli</i> coprodutora de NDM-KPC	29
2.3.1 ENZIMA KLESSIELLA PNEUMONIAE CARBAPENEMASE (KCP)	30
2.3.2 NEW DELHI METALO-B-LACTAMASE (NDM)	30
2.2 Família Apocynaceae	32
2.2.3 GÊNERO <i>GEISSOSPERMUM</i>	34
2.2.3.4 <i>Geissospermum laeve</i> (Vell.) Miers	36
3 OBJETIVOS	47
3.1 Geral	47
3.2 Específicos	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.2 Material	48
4.2.1 EQUIPAMENTOS	48
4.2.2 SOLVENTES, FASES ESTACIONÁRIAS E DEMAIS REAGENTES	49
4.2.3 MATERIAL DE PLÁSTICO, METAIS E VIDRARIAS	49
4.2.4 MEIO DE CULTURA E ENRIQUECIMENTO	50
4.2.5 PREPARO DE REVELADORES	50
4.2.5.1 Reagente de Dragendorff	50

4.2.6 PREPARO DE MEIOS PARA O ENSAIO ANTIMICROBIANO.....	51
4.2.7 MATERIAL BIOLÓGICO	51
4.2.8 MATERIAL VEGETAL	51
4.3 Métodos	52
4.3.1 ESTUDO FITOQUÍMICO	52
4.3.1.1 Obtenção do extrato, fração e isolamento do alcaloide	52
4.3.1.1.1 <i>Caracterização do extrato e frações</i>	53
4.3.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA	54
4.3.2.1 Atividade antimicrobiana.....	54
4.3.2.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos controles - TSAC.....	55
4.3.2.3 Concentração inibitória mínima - CIM.....	56
4.3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO PELO MÉTODO DO TABULEIRO DE XADREZ (<i>CHECKERBOARD</i>).....	57
4.3.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME	58
4.3.5 AVALIAÇÃO <i>IN SILICO</i>	59
5 RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO	61
5.1 Estudo Fitoquímico	61
5.2 Atividades Biológicas.....	69
5.3 Estudos <i>in silico</i>	80
5 CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS.....	96

1 INTRODUÇÃO

O aumento da resistência bacteriana é um grave problema de saúde pública e decorre de uma série de fatores, que vão desde o uso indiscriminado de antibióticos até o descarte inadequado desses agentes no meio ambiente, promovendo uma pressão seletiva sobre um número cada vez maior de microrganismos e limitando o arsenal terapêutico disponível (Croft; Antoni; Terzulli, 2007; Roca *et al.*, 2015). Em 2019, 1,27 milhão de mortes foram diretamente causadas por infecções por bactérias multirresistentes, e 4,95 milhões de óbitos estiveram relacionados a complicações decorrentes dessas infecções, tornando a resistência antimicrobiana uma das principais causas de morte, superando até mesmo a AIDS e a malária. Sem medidas eficazes, estima-se que esse problema poderá causar até 10 milhões de mortes anuais até 2050 (Croft; Antoni; Terzulli, 2007; Roca *et al.*, 2015; Murray *et al.*, 2022).

A aquisição desses mecanismos de evasão aos fármacos ocorre por meio de alterações genéticas, que podem surgir tanto de forma espontânea, como resposta a uma pressão sofrida, quanto por processos de transferência genética entre microrganismos. Essas alterações podem modificar desde os sítios de ação até a produção de enzimas específicas capazes de degradar o fármaco (Booton *et al.*, 2021). As bactérias podem ser classificadas em grupos distintos de resistência, organizados com base na falha em responder a um fármaco específico, a grupos de fármacos ou a todos os fármacos existentes, sendo necessário buscar alternativas terapêuticas que possam atuar como novos antimicrobianos e/ou nos mecanismos de resistência (Thabit; Crandon; Nicolau, 2015).

O uso de plantas medicinais para esses fins não é novidade, pois os usos tradicionais alimentam uma cadeia de informações que permitem investigar o potencial de uma determinada espécie para esse propósito. Dessa forma, plantas com uso alegado no tratamento de infecções ou condições sabidamente bacterianas, como a erisipela, podem oferecer a resposta necessária ao problema discutido acima (Cheesman *et al.*, 2017).

Na Amazônia, as plantas da família Apocynaceae ganham destaque, principalmente por seus usos populares no tratamento de agravos infecciosos e

inflamatórios (Bhadane *et al.*, 2018). O gênero *Geissospermum* se destaca por sua capacidade de produzir alcaloides, um grupo de metabólitos que, sabidamente, atuam sobre a homeostase corporal, podendo promover respostas a estados alterados de saúde mediados por patógenos. Dentro do gênero, *Geissospermum laeve* é uma espécie proeminente, sendo considerada uma das dez plantas medicinais brasileiras de maior relevância (Peckolt, 1942 *apud* Almeida *et al.*, 2009).

A *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers é uma árvore nativa, mas não endêmica do Brasil, com ampla distribuição nos biomas brasileiros. Na região Norte, é encontrada nos estados do Pará, Amazonas e Amapá. É popularmente conhecida como pau-pereira, pau-forquilha, camará-do-mato, camará-de-bilro e pau-de-pente (Reflora, 2023). Entre os usos populares atribuídos a *G. laeve*, destacam-se suas propriedades antimaláricas (Muñoz *et al.*, 2000), antipiréticas, estimulantes sexuais, no tratamento de distúrbios do trato gastrointestinal (Tavares, 2008), infecções fúngicas e como antisséptico (Fenner *et al.*, 2006), além de ser utilizada para tratar erisipela, diarreias crônicas, hemorragias e astenia (Almeida *et al.*, 2009). Os primeiros alcaloides isolados da espécie foram a pereirina (século XIX) e a flavopereirina (século XX). Com o aprimoramento da técnica de partição ácido-base, foram isolados a geissospermina, a vellosimina, a geissoschizolina, o velosiminol, a geissosvellina e a geissolasimina (Brandão, 2012).

Brandão (2012) demonstrou que o extrato etanólico obtido das cascas de *G. vellosi* possuem atividade bacteriostática frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Saraiva e colaboradores (2012) demonstraram que o extrato etanólico possui atividade frente a cepas *S. aureus* oxacilina resistente (ORSA). Partindo então, da compreensão da existência de uma atividade antimicrobiana associada à *Geissospermum laeve* este trabalho caracteriza a ação estremada de um alcaloide isolado da espécie frente a bactérias, além de seu efeito sinérgico sobre os antimicrobianos convencionais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Resistência a antimicrobianos

Os antimicrobianos são agentes farmacológicos que atuam na diminuição da proliferação ou na morte de microrganismos, sendo classificados, de acordo com sua ação, como bactericidas ou bacteriostáticos (Abushaheen *et al.*, 2020). Eles formam um grupo relativamente pequeno de fármacos, divididos em classes, gerações e mecanismos de ação. Entre os antimicrobianos mais comuns estão as quinolonas, os macrolídeos e os β -lactâmicos, sendo estes últimos os principais agentes utilizados, tanto em infecções adquiridas na comunidade (como as pneumonias adquiridas na comunidade e tratadas com penicilinas) quanto em infecções nosocomiais (como a sepse, tratada com carbapenêmicos; Abushaheen *et al.*, 2020).

As atuais classes de antimicrobianos disponíveis no mercado estão se tornando eficazes para um número cada vez mais limitado de patógenos. Alguns fatores podem contribuir com a resistência, como o uso indiscriminado, a falta de adesão ao tratamento, a utilização de doses subótimas ou ao descarte incorreto desses agentes (Greni; Ancona; Caracciolo, 2018; Sweileh *et al.*, 2021; D'ambrosio *et al.*, 2022; Gomes, 2022).

Assim, as bactérias são classificadas em resistentes a múltiplos fármacos (RMF; do inglês *multidrug-resistant*, MDR), quando o microrganismo é resistente a pelo menos um fármaco em três ou mais grupos de antimicrobianos; extensivamente resistentes (ER; do inglês *extensively drug-resistant*, XDR), referindo-se aos que são resistentes a pelo menos um fármaco em todos os grupos de antimicrobianos; e pan-resistentes (PR; do inglês *pandrug-resistant*, PDR), que são os microrganismos que não respondem a nenhum fármaco em nenhum grupo (Magiorakos *et al.*, 2012).

A resistência pode ocorrer por processos associados a fenótipo esperado resistente e/ou extrínsecos ao patógeno (Tornimbene *et al.*, 2018). O fenótipo esperado resistente (anteriormente resistência intrínseca) são aqueles naturais ao patógeno, ou seja, características genéticas que fazem parte da sua biologia básica e que não podem ser transferidas para outras bactérias. Por outro lado, os fenótipos

de resistência adquiridos (ou extrínsecos) resultam de uma complexa rede de compartilhamento genético, que envolve processos como recombinação, transferência horizontal de genes (THG) e mutações, permitindo ao patógeno garantir sua sobrevivência e adaptação a ambientes hostis (Allen; Stanton, 2014; Munita; Arias, 2016; Hu; Gao; Zhu, 2017). A resistência a antimicrobianos é um processo pelo qual microrganismos que anteriormente sensíveis a um fármaco ou grupo de fármacos, passam a não responder de forma satisfatória à sua ação, resultando no aumento da proliferação do agente infeccioso e à cronificação da infecção (Tornimbene *et al.*, 2018).

Dentro do processo de recombinação genética encontram-se as mutações e THG. A primeira ocorre em bactérias susceptíveis, enquanto a segunda geralmente advém de outras bactérias ou de um meio que as estressa, estando relacionada, *a priori*, à obtenção de um gene de resistência (ARG, do inglês *Antibiotic Resistance Gene*) por meio de agentes de transferência genética, como conjugação, transdução e transformação (Depardieu *et al.*, 2007; Munita; Arias, 2016; Zhuang *et al.*, 2021).

Os agentes de transferência de genes são entidades semelhantes a vírus que codificam e empacotam uma sequência aleatória de genes que foram liberadas durante o processo de lise da parede celular. Nesse sentido, nem sempre as sequências obtidas corresponderão a uma que permita sua tradução em componentes proteicos. Embora todo esse processo seja coordenado por mecanismos de regulação, a aquisição de um gene de resistência por meio desse mecanismo é mais limitada (Figura 1; McDaniel *et al.*, 2010; Arnold; Huang; Hanage, 2022).

A conjugação se configura como um método direto para a obtenção de genes de resistência. Para que ela ocorra, é necessário que as bactérias estejam próximas. Durante o contato superficial entre as células, os anexos bacterianos (adesinas ou pili) promovem a transferência dos ARG de um doador, que possui o fator F – um DNA capaz de se autorreplicar de maneira independente e de formar um *pilus* sexual, para um receptor que não possui o fator F. Esse pedaço de DNA extracromossômico recebe o nome de plasmídeo, e, dentre os plasmídeos, o fator F é o modelo mais comum (Von Wintersdorff *et al.*, 2016; Virole *et al.*, 2020).

A transdução é um processo mediado por agentes virais, os bacteriófagos, que são capazes de transferir DNA cromossômico e elementos genéticos móveis (EGM),

os quais codificam enzimas e proteínas que facilitam a mobilidade intra e intercelular, de uma bactéria para outra. Como agentes ubíquos, os bacteriófagos são um dos principais meios de aquisição de ARG. A transdução pode ocorrer de forma generalizada, em que virtualmente qualquer gene pode ser transportado de uma bactéria para outra, embora seja um processo pouco eficiente. Por outro lado, na transdução especializada, ocorre a transferência de um gene específico entre as bactérias, sendo esse tipo de transdução mediado por bacteriófagos lisogênicos (Yang et al., 2021; Weisberg e Chang, 2023).

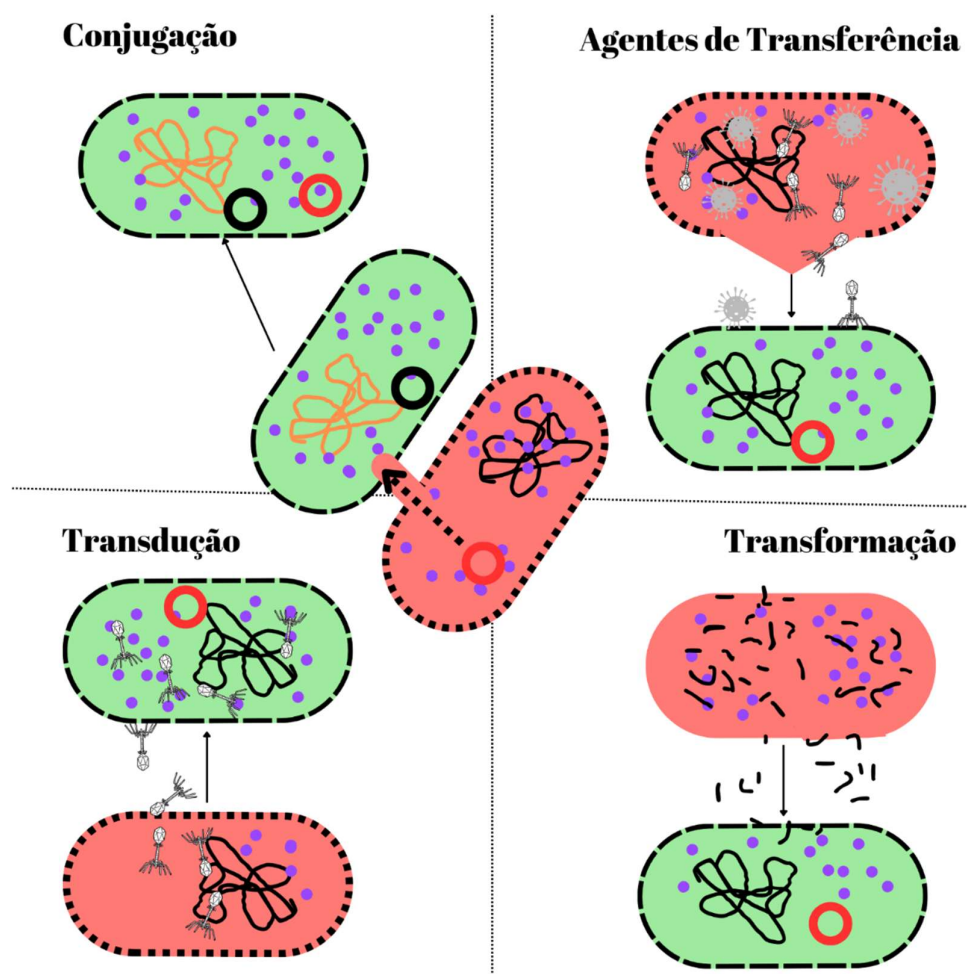


Figura 01 – Esquemática dos eventos de transferência de ARG. Fonte: Autor, 2024.

Já a transformação ocorre quando a bactéria capta o DNA livre no meio ambiente e o internaliza, promovendo sua incorporação ao material genético celular.

Entretanto, nem todas as bactérias são capazes de realizar esse processo. As que realizam essa ação por meio de proteínas de competência (Com) são conhecidas como "competentes". Assim, ao ser capturado, o DNA desencadeia um processo de recombinação que requer homologia entre o DNA doador e o do hospedeiro para ser bem-sucedido (Wilharm *et al.*, 2010).

Existem alguns elementos que facilitam a aquisição de genes de resistência, como os plasmídeos, que são autorreplicáveis e extracromossomais, atuando principalmente na conjugação. Os elementos transponíveis, que por sua vez, são aqueles que podem se movimentar ao longo da cadeia de DNA por meio de transposição, estando localizados dentro dos plasmídeos e permitindo a captura ou eliminação de ARG (Fan *et al.*, 2019). Os integrons, que não são móveis, mas possuem capacidade recombinante, são capazes de integrar ou mover informações presentes no cassete gênico e, por esse processo, conduzir ARG de uma bactéria para outra (Bennett, 1999; Carattoli, 2001; Sabbagh *et al.*, 2021).

Nesse contexto, é comum que, quando os agentes antimicrobianos são administrados em doses subterapêuticas ou em combinações pouco eficazes ou antagônicas, haja indução da produção de peptídeos antimicrobianos (PAMs) e alterações na parede celular bacteriana, favorecendo, por exemplo, a ativação de bombas de efluxo (Assoni *et al.*, 2020; Koutsoumanis *et al.*, 2021). Essa resistência pode ocorrer de forma cruzada, em que o uso de agentes antimicrobianos em doses subótimas pode levar a polimorfismos de ganho de função, principalmente na parede celular. Além disso, a produção de biofilmes caracteriza-se como um forte indutor de resistência cruzada, uma vez que, como fator de virulência, o biofilme dificulta a destruição das colônias e promove um ambiente controlado de pressão seletiva (Monteiro *et al.*, 2016; Uruén *et al.*, 2020). A partir desses mecanismos, de forma individual ou combinada, as bactérias são capazes de desenvolver ou adquirir resistência aos antimicrobianos.

2.1.1 ALTERAÇÃO DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À PENICILINAS (PBP)

Essas proteínas estão envolvidas no metabolismo da parede celular bacteriana, atuando como transpeptidases ou carboxipeptidases. Os motivos que

codificam a família de enzimas de reconhecimento de penicilina com serina no sítio ativo (conhecida pela sigla em inglês PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) são as SXXK, (S/Y)XN e (K/H)(S/T)G, sendo a serina presente no motivo SXXK fundamental para o processo catalítico que leva à formação do peptidoglicano (Zapun; Contreras-Martel; Vernet, 2008; Sauvage *et al.*, 2008; Darby *et al.*, 2023).

Nas transpeptidases, a serina do sítio ativo se liga a uma carbonila *D*-alanil, que sofre um ataque nucleofílico por uma amina primária ligada a resíduos terciários de outra cadeia peptídica. Essa interação é descrita como “doadora-aceptora” e resulta na formação de uma ponte peptídica entre os dois peptídeos curtos, estabelecendo uma ligação entre as cadeias de glicano. Por sua vez, nas *DD*-carboxipeptidases, o intermediário acil-enzimático é hidrolisado, resultando na eliminação dos peptídeos haste da cadeia denominados “doadores” do peptidoglicano. Esse mecanismo é fundamental para a formação e manutenção estrutural da parede celular bacteriana, especialmente no que diz respeito à resistência a antibióticos β -lactâmicos (Uddin *et al.*, 2021; Urban-Chmiel, 2023).

Os antibióticos β -lactâmicos atuam imitando o processo descrito acima, onde o substrato dipeptídeo *D*-Ala-*D*-Ala, ligando-se irreversivelmente aos sítios eletrostáticos negativos das PBPs. Dessa forma, em vez de a serina atacar a carbonila do substrato no sítio ativo, ela ataca a carbonila do anel β -lactâmico, resultando na abertura do anel e na formação de um complexo covalente acil-enzimático, levando a morte celular (Sulaiman; Roberts; Abdul-Aziz, 2022). No entanto, o uso em larga escala das penicilinas, muitas vezes de forma irracional, propiciou o surgimento de cepas resistentes, com alterações nas PBPs, que reduziram sua afinidade pelos β -lactâmicos (Sulaiman; Roberts; Abdul-Aziz, 2022).

2.1.2 PRODUÇÃO DE β -LACTAMASES

As β -lactamases são enzimas responsáveis pela hidrólise do anel β -lactâmico presente em uma ampla variedade de antibióticos, incluindo penicilinas e carbapenêmicos. Essas enzimas podem ser classificadas com base em dois sistemas principais. A primeira, a Classificação de Ambler, organiza as β -lactamases em quatro classes (A, B, C e D) de acordo com a homologia da sequência de aminoácidos e a estrutura da enzima. A segunda, a Classificação de Bush-Jacoby-

Medeiros, agrupa as β -lactamases em função de sua atividade enzimática, dividindo-as nos Grupos 1, 2 (subdivididos em subgrupos a-f), 3 e 4, considerando também as propriedades específicas dos substratos que essas enzimas hidrolisam. Essa dualidade de classificação permite uma compreensão mais precisa da diversidade e das funções das β -lactamases, o que facilita o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra infecções resistentes. (Samaha-Kfoury; Araj, 2003; Bush, 2023).

As β -lactamases da Classe A incluem enzimas de espectro estendido (ESBL, do inglês *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*), que têm a capacidade de hidrolisar tanto penicilinas quanto cefalosporinas. No entanto, essas enzimas podem ser inibidas por compostos como o ácido clavulânico. Um exemplo representativo é o gene *TEM*, que sofre mutações frequentemente transmitidas por plasmídeos e é amplamente encontrado em enterobactérias. Além disso, dentro dessa classe, destacam-se as carbapenemases, que hidrolisam os carbapenêmicos (Samaha-Kfoury; Araj, 2003; Philippon *et al.*, 2016). Por outro lado, as β -lactamases da Classe B são Metalobeta-lactamases (MBLs), que requerem um íon de zinco (Zn^{2+}) para a ativação de sua atividade enzimática. Essas enzimas são capazes de hidrolisar todos os antibióticos β -lactâmicos, exemplo notável é a imipenemase, codificada pelo gene *bla_{IMP}* (Pongchaikul; Mongkolsuk, 2023).

Na Classe C, encontram-se as β -lactamases cromossômicas ou plasmídicas, responsáveis pela resistência às cefalosporinas, sendo por isso frequentemente denominadas *AmpC*. Essas enzimas são codificadas por genes como *CMY*, *DHA* e *FOX* (Philippon *et al.*, 2022). Por outro lado, as β -lactamases da Classe D estão associadas à resistência a oxacilinas e carbapenêmicos, sendo codificadas por genes *OXA*. Devido a essa característica, são também conhecidas como oxacilinases (Yoon; Jeong, 2021).

2.1.3 ALTERAÇÕES NA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA CELULAR

A parede celular das bactérias Gram-positivas é predominantemente composta por peptidoglicano, além de polímeros ácidos lineares, como os ácidos teicoicos e teicurônicos, que são aniônicos. A presença de canais transportadores, como as porinas, também contribui para uma maior permeabilidade dessas bactérias aos antibióticos. Contudo, alguns mecanismos podem modificar a permeabilidade da

parede celular, resultando em uma redução da entrada de fármacos o que favorece o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos (Lambert, 2002; Malanovic; Lohner, 2016).

Um dos mecanismos de resistência envolve a modificação dos ácidos teicoicos e lipoteicoicos, moléculas que se ligam à parede celular e possuem carga negativa devido a presença de grupos fosfatos. Essa modificação diminui a capacidade de ligação dos antibióticos carregados positivamente, como as polimixinas, dificultando sua interação com a bactéria. Como resultado, a ação do antibiótico é comprometida, impedindo a sua ligação eficaz à parede celular e, consequentemente, a lise bacteriana. Esse mecanismo tem sido associado à resistência bacteriana às polimixinas (Xia; Kohler; Peschel, 2010; Han *et al.*, 2023).

Outro mecanismo de resistência envolve a modificação de fosfolípidios, como o fosfatidilglicerol, fosfatidilserina e fosfatidilcolina, que alteram a carga da parede celular bacteriana, conferindo resistência a antimicrobianos. Os genes *cls* (do inglês *cardiolipin synthases*) são responsáveis pela biossíntese da cardiolipina, um fosfolípido essencial nas membranas bacterianas. A indução desses genes pode resultar em alterações na composição dos fosfolípidios da membrana, dificultando a ação de antibióticos dependentes da interação com a carga da célula, como a daptomicina (Davlieva *et al.*, 2013; Leeten *et al.*, 2024). De maneira geral, os mecanismos de resistência que envolvem alterações na permeabilidade da membrana celular estão associados à neutralização das cargas da parede bacteriana, o que diminui ou anula a eficácia de fármacos que dependem dessa interação para exercerem sua ação.

2.1.4 EFLUXO ATIVO DE ANTIBIÓTICOS

As bombas de efluxo constituem um grupo de famílias transportadoras responsáveis pela expulsão de substâncias tóxicas do interior da célula bacteriana para o meio extracelular. Elas são classificadas em diferentes famílias com base em sua estrutura, número de regiões transmembranares, fontes de energia e substratos transportados. As principais famílias incluem a família de Resistência-Nodulação-Divisão (RND), a Superfamília de Facilitadores Principais (MFS, do inglês *Major Facilitator Superfamily*), a Superfamília de Cassete de Ligação ao ATP (ABC, do

inglês *ATP-binding cassette*), a Família de Pequena Resistência a Múltiplas Drogas (SMR, do inglês *Small Multidrug Resistance*), e a Família de Extrusão de Multidrogas e Compostos Tóxicos (MATE, do inglês *Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) (Hassan *et al.*, 2015; Thakur; Uniyal; Tiwari, 2021). Esses sistemas desempenham um papel crucial na resistência bacteriana, permitindo a eliminação ativa de uma ampla variedade de fármacos e compostos tóxicos, dificultando o tratamento de infecções.

Esses componentes são expressos de maneira variável entre diferentes grupos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A única exceção é o sistema de efluxo do tipo RND, que é exclusivo de bactérias Gram-negativas. Além disso, o sistema RND distingue-se das demais bombas de efluxo por sua estrutura tripartida, composta por três componentes principais (uma bomba de membrana interna, uma proteína de fusão de membrana e uma porina externa), enquanto outros sistemas de efluxo geralmente possuem apenas um componente (Thakur; Uniyal; Tiwari, 2021). A regulação das bombas de efluxo é um processo multifatorial, envolvendo sistemas de dois componentes, reguladores transcricionais, pequenos RNAs regulatórios e sinais ambientais. Quando esses sistemas detectam a presença de antimicrobianos no ambiente, desencadeiam uma cascata de sinalização complexa que resulta na ativação das bombas de efluxo, promovendo a extrusão ativa desses fármacos para o exterior da célula bacteriana (Thakur; Uniyal; Tiwari, 2021).

2.1.5 FORMAÇÃO DE BIOFILME

O biofilme é uma rede complexa e altamente organizada, formada por uma diversidade de microrganismos patogênicos como estratégia de proteção e sobrevivência. Ele se desenvolve a partir da associação e adesão de microrganismos a superfícies, onde se multiplicam e secretam uma matriz extracelular. O principal componente estrutural dessa matriz são os exopolissacarídeos bacterianos (EPS, do inglês *Extracellular Polymeric Substances*), polímeros naturais sintetizados pelas bactérias e compostos por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Os EPS frequentemente constituem a maior fração do biofilme, fornecendo suporte mecânico e funcional à estrutura (Zhang; Bishop, 1994; Sharma *et al.*, 2023). Além disso, o biofilme contém uma significativa

quantidade de água, que confere viscosidade à matriz e facilita a difusão de nutrientes essenciais para a sobrevivência e proliferação dos microrganismos que o compõem (Sharma *et al.*, 2023)

A formação do biofilme inicia-se com a adesão dos microrganismos a uma superfície, que pode ser orgânica ou inorgânica. Essa adesão é mediada por interações físicas e, principalmente, químicas, como ligações hidrofóbicas e iônicas. Em seguida, ocorre a etapa de colonização, caracterizada pela expansão da colônia bacteriana por meio da formação de microcolônias ou aglomerados celulares. Esse processo é facilitado pela expressão de adesinas, como fimbrias ou *pili*, que promovem a fixação das células à superfície e a coesão entre os microrganismos. Por fim, na etapa de maturação, ocorre o crescimento bacteriano e a secreção do EPS, que formam uma matriz extracelular protetora ao redor do biofilme. Essa matriz confere resistência e estabilidade à estrutura, que se torna funcionalmente heterogênea devido à diversidade de microrganismos e condições microambientais. Além disso, em certas situações, partes do biofilme podem se desprender e migrar para outras superfícies, onde iniciam um novo ciclo de colonização e formação de novos biofilmes (Figura 02; Costerton; Stewart; Greenberg, 1999; Sharma *et al.*, 2023; Datta; Nag; Roy, 2024).

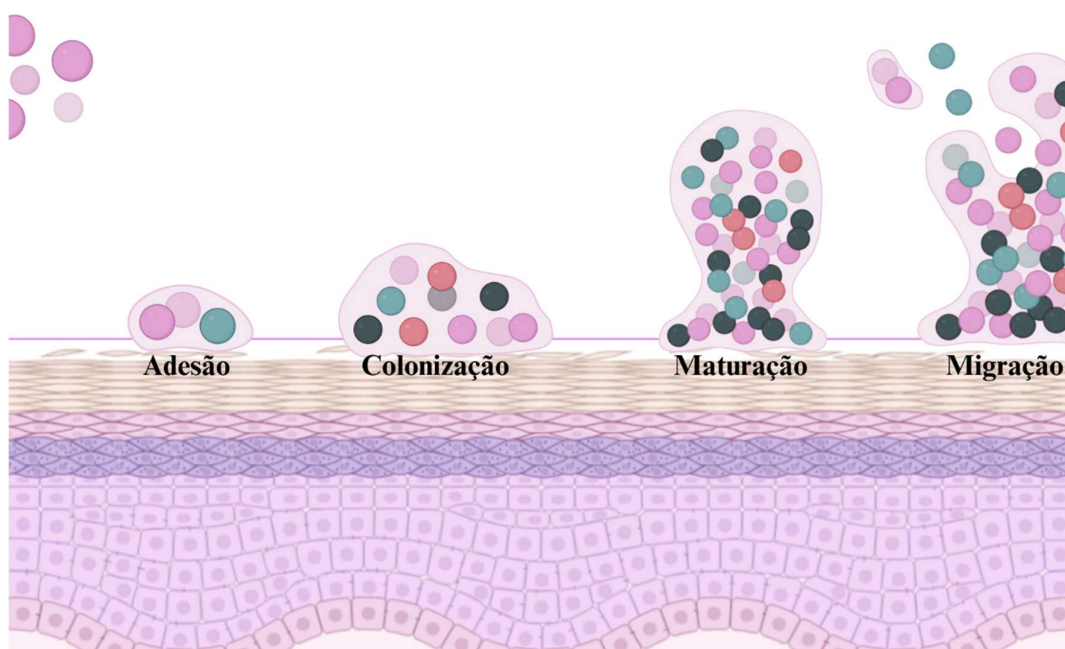


Figura 02 – Representação icnográfica da formação do biofilme. Fonte: Autor, 2025.

Em bactérias Gram-positivas, especialmente em *Staphylococcus aureus*, o sistema de *quorum sensing agr* (*Accessory Gene Regulator*) desempenha um papel crucial na formação de biofilmes. Esse sistema regula a expressão de genes em resposta ao aumento da densidade populacional da colônia, que é detectado por meio de moléculas sinalizadoras conhecidas como peptídeos autoindutores (AIP, do inglês *Auto-Inducing Peptides*). À medida que a concentração de AIP aumenta no ambiente, a regulação negativa do sistema *agr* é interrompida, levando à ativação da expressão de genes associados à produção de fatores de virulência e à adesão celular. Esses genes, por sua vez, promovem a formação de biofilmes e a expressão de mecanismos que facilitam a colonização e a persistência bacteriana (Tan *et al.*, 2018; Piewngam; Otto, 2020).

O biofilme, além de conferir proteção física e dificultar a penetração de agentes sanitizantes e antimicrobianos, facilita a aquisição de fenótipos esperados resistentes. Isso ocorre por meio de mecanismos como a THG ou a transformação, mediada por ácidos nucleicos extracelulares (e.g., eDNA, *extracellular DNA*) presentes na matriz de EPS que compõem o biofilme (Flemming *et al.*, 2016; Maddamsetti *et al.*, 2024). Além disso, as bactérias presentes no biofilme são capazes de superexpressar enzimas antioxidantes, como catalase e superóxido dismutase (SOD), que as protegem contra espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas EROs são geradas tanto pelas células do sistema imunológico do hospedeiro quanto por certos antibióticos, que induzem estresse oxidativo como parte de seu mecanismo de ação (Pandey; Sahukhal; Elasri, 2019; Seixas *et al.*, 2022).

2.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)

Os *Staphylococcus aureus* são patógenos Gram-positivos de interesse clínico, envolvidos em diferentes processos de agravos à saúde. Por serem ubíquos, estão associados a processos de adoecimento que variam de casos ambulatoriais a hospitalares, fazendo parte da microbiota normal dos mamíferos, habitando principalmente a pele, fossas nasais e mucosas (Ondusko; Nolt, 2018). Quando

ocorre a invasão desses microrganismos para o interior do hospedeiro, seja por via hematogênica ou por contato direto com secreções de pessoas infectadas, pode desencadear um processo infeccioso difuso (Pidwill *et al.*, 2021).

Entre os patógenos prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS), encontra-se o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, do inglês *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) com resistência intermediária ou total a Vancomicina, é classificado como prioridade alta para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (OMS, 2024). A resistência aos fármacos β -lactâmicos envolve principalmente a produção de uma enzima chamada β -lactamase e a modificação de proteínas-alvo, além de outros mecanismos que contribuem para a resistência, como a produção de biofilme (Gherardi, 2023).

A resistência a meticilina está relacionada à produção da PBP2a, codificada pelo gene *mecA*. A PBP2a, que é naturalmente expressa nessa cepa, possui baixa afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos, permitindo que a síntese da parede celular ocorra mesmo na presença desses antibióticos (De Lencastre *et al.*, 1994; Lade; Kim, 2023). O gene *mecA* é regulado por dois elementos: o gene *mecI* e a proteína *mecR1*. Quando o microrganismo não está exposto aos β -lactâmicos, o gene *mecI* suprime a expressão de *mecA* e, consequentemente, a síntese de PBP2a. Por outro lado, na presença de β -lactâmicos, a proteína *mecR1* é ativada e promove a clivagem de *mecI*, revertendo a supressão e permitindo a transcrição de *mecA* e a produção de PBP2a (De Lencastre *et al.*, 1994; Lade; Kim, 2023).

Entre outros mecanismos que podem auxiliar a evasão e/ou na virulência da MRSA, encontram-se a expressão de diversas bombas de efluxo, principalmente associadas ao sistema de dois componentes e a reguladores transcricionais (Costa *et al.*, 2013). As bombas NorA, NorB e, com menor eficácia, NorC, estão envolvidas na resistência a fármacos como quinolonas, sendo acopladas a prótons de hidrogênio (H^+ ; Brawley *et al.*, 2022). A bomba MepA, regulada pelo gene *MepR*, confere resistência a diversos antimicrobianos, incluindo glicopeptídeos, tetraciclina, macrolídeos e quinolonas. Seu mecanismo de ação é semelhante ao das bombas Nor, e frequentemente é coexpressa com estas, resultando em resistência a múltiplos fármacos MDR (Oliveira-Tintino *et al.*, 2023).

Em MRSA, as β -lactamases mais prevalentes pertencem à Classe A, particularmente aquelas codificadas pelo gene *blaZ*. O processo de resistência inicia

com a ativação do sensor-transdutor *BlaR1*, que, na presença de antibióticos β -lactâmicos, desencadeia uma cascata de sinalização que resulta na clivagem da proteína repressora *BlaI*, responsável pela regulação negativa da expressão do gene *blaZ*. Uma vez liberado da repressão, o gene *blaZ* é expresso, levando à produção da β -lactamase PC1, que é a enzima responsável pela hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos (Alexander *et al.*, 2023).

2.3 *Escherichia coli* coprodutora de NDM-KPC

As *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos estão classificadas entre os patógenos críticos prioritários para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento, conforme destacado pela OMS (2024). A aquisição de resistência a antimicrobianos nesses patógenos é mediada principalmente por genes adquiridos por THG ou por mutações cromossômicas. Entre os mecanismos de resistência, as enzimas modificadoras de antibióticos, como as carbapenemases, destacam-se por sua eficácia, ampla distribuição e impacto clínico significativo. Essas enzimas são capazes de hidrolisar carbapenêmicos e outros β -lactâmicos, contribuindo para a rápida disseminação da resistência e para o aumento das taxas de mortalidade associadas a infecções por esses patógenos (Bush; Bradford, 2020; Islam *et al.*, 2021).

A *Escherichia coli* é uma enterobactéria Gram-negativa fermentadora de glicose, pertencente à microbiota normal de mamíferos, incluindo seres humanos, onde desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase do trato gastrointestinal (Kaper; Nataro; Mobley, 2004). Devido às suas características metabólicas versáteis, a *E. coli* é capaz de colonizar diversos ambientes, como a água e o solo. Além disso, as cepas de *E. coli* possuem uma notável capacidade de adquirir genes de virulência, facilitada por mecanismos como a THG, a presença de EGM (e.g., plasmídeos, transposons) e uma elevada adaptabilidade genética. Essas características permitem que cepas comensais se transformem em patogênicas, adquirindo fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade (Pakbin; Brück; Rossen, 2021).

2.3.1 ENZIMA KLESSIELLA PNEUMONIAE CARBAPENEMASE (KCP)

As enzimas KPCs (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases) são carbapenemases da Classe A, inicialmente isoladas em *Klebsiella pneumoniae*. Além de hidrolisar carbapenêmicos, essas enzimas também são capazes de degradar outros antibióticos β -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas. Essa atividade de amplo espectro contra β -lactâmicos reduz drasticamente as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções causadas por patógenos produtores de KPCs, representando um desafio significativo para o controle de infecções (Islam *et al.*, 2021).

O gene responsável pela produção da KPC é o *bla_{KPC}*, frequentemente encontrado em EGM, como plasmídeos, integrons e transposons. No entanto, em alguns casos, esse gene pode estar associado ao cromossomo de determinadas bactérias. Existem diversas variantes do gene *bla_{KPC}* que têm sido implicadas em surtos hospitalares, e essas variantes, particularmente *bla_{KPC}-2* e *bla_{KPC}-3*, estão associadas a um nível ainda maior de resistência aos carbapenêmicos, tornando essas cepas ainda mais patogênicas (Migliorini *et al.*, 2021; Zou *et al.*, 2022). A crescente prevalência de cepas de *E. coli* que apresentam resultados positivos para a expressão do gene *bla_{KPC}* em isolados clínicos levanta preocupações significativas, destacando o caráter adaptativo deste patógeno, o que dificulta o tratamento eficaz e contribui para a disseminação de resistência antimicrobiana no ambiente hospitalar (Logan; Weinstein, 2017; Tamma *et al.*, 2021).

2.3.2 NEW DELHI METALO- β -LACTAMASE (NDM)

A coprodução de enzimas por bactérias representa uma ameaça significativa à saúde global, devido à sua resistência a múltiplos antibióticos e à facilidade com que podem se disseminar (Wan *et al.*, 2024). A NDM (*New Delhi* metallo- β -lactamase) é uma enzima carbapenemase pertencente à Classe B, que contém um íon de Zn^{2+} responsável pela hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos, levando à sua inativação. Entretanto, os monobactâmicos, como o aztreonam, permanecem relativamente insensíveis à ação da NDM (Nordmann *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2019). A

disseminação de cepas produtoras dessa enzima compromete gravemente as opções terapêuticas, especialmente no tratamento de infecções resistentes a antibióticos de última linha, como os carbapenêmicos.

O gene responsável pela expressão da NDM é o *bla*_{NDM}, que, após ser transcrito em RNA mensageiro (mRNA) é traduzido em proteína, resultando na produção da enzima NDM. A aquisição desse gene está frequentemente associada a EGM, principalmente plasmídeos (Wu *et al.*, 2019). A concentração dessa enzima ocorre no espaço periplasmático, localizado entre a membrana citoplasmática e a membrana externa. Nesse espaço, forma-se uma matriz viscosa que abriga diversas enzimas, proteínas, subprodutos do metabolismo bacteriano e substratos essenciais para várias reações bioquímicas (Martínez *et al.*, 2021). A presença de NDM no periplasma contribui para a hidrólise dos β -lactâmicos, desempenhando um papel crucial na resistência antimicrobiana (Martínez *et al.*, 2021).

A NDM-1 foi isolada pela primeira vez de uma cepa de *E. coli* em um paciente na Índia e é a variante mais amplamente reconhecida. A aquisição do gene *bla*_{NDM} ocorre por conjugação, transformação ou transdução (Thapa *et al.*, 2022; Thelo *et al.*, 2022). As cepas de *E. coli* que carregam NDM-1 representam um sério risco à saúde pública, uma vez que estão associadas a condições de saúde graves, como infecções do trato urinário (ITUs), sepse e infecções intra-abdominais, em alguns casos, a mortalidade associada a essas infecções pode atingir até 70% (Logan; Weinstein, 2017; Tilahun *et al.*, 2021). O caráter altamente patogênico dessas cepas resistentes a carbapenêmicos torna o tratamento extremamente desafiador, especialmente em contextos hospitalares, onde a disseminação de tais cepas pode ocorrer rapidamente (Mari-Almirall *et al.*, 2021).

Nesse contexto, torna-se essencial a busca por alternativas terapêuticas capazes de combater bactérias resistentes, seja atuando de forma direta ou sinérgica com os antibióticos disponíveis, ou ainda, bloqueando os mecanismos de resistência. As plantas medicinais se apresentam como uma opção promissora nesse cenário, pois o uso de extratos, frações e substâncias isoladas tem demonstrado significativa atividade contra diversas cepas patogênicas. Essas substâncias naturais podem representar uma abordagem inovadora no combate à resistência antimicrobiana, oferecendo potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Chassagne *et al.*, 2021).

Dentre as classes com compostos com atividade antimicrobiana, destacam-se os alcaloides. O alcaloide isoquinolínico *spathullin* B apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) de 1,0 µg/mL frente a *S. aureus* sensível, enquanto a cheleritrina apresentou CIM de 1,9 µg/mL contra *Pseudomonas aeruginosa* (Nord *et al.*, 2019; Zielińska *et al.*, 2019). Entre os alcaloides piridínicos, o N-formilconessimina exibiu atividade antimicrobiana nas concentrações de 32 e 128 µg/mL (Zhou *et al.*, 2017). A *voacafricine* B demonstrou atividade com CIMs de 3,12 µg/mL e 0,78 µg/mL frente a *S. aureus* e *Salmonella typhimurium*, respectivamente (Ding *et al.*, 2018). Já os alcaloides esteroidais, como o *mokluangin* B, apresentaram atividade moderada, com CIM de 36 µg/mL, frente a *Bacillus subtilis* e *E. coli* (Cheenpracha *et al.*, 2016). Estes resultados destacam o potencial dos alcaloides como fontes promissoras de novos agentes antimicrobianos, especialmente contra patógenos resistentes.

Entre as plantas medicinais ricas em alcaloides, destacam-se aquelas pertencentes à família Apocynaceae, cujos gêneros mais notáveis incluem *Angadenia* sp., *Apocynum* sp., *Asclepias* sp., *Catharanthus* sp., *Ceropegia* sp., *Cynanchum* sp., *Gonolobus* sp., *Hoya* sp., *Mandevilla* sp., *Morrenia* sp., *Secamone* sp., *Vallesia* sp. e *Geissospermum* sp. Os alcaloides indólicos e bis-indólicos são os principais representantes dessa família, sendo responsáveis por uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo a atividade antimicrobiana. A diversidade de compostos bioativos presentes nas espécies dessa família torna-as fontes promissoras para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, com destaque para a ação antimicrobiana (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2020; Patil; Patil; Maheshwari, 2023).

2.2 Família Apocynaceae

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Asteranae Takht.

Ordem: Gentianales Juss. Ex Bercht. & J. Presl

A família Apocynaceae é um grupo botânico altamente diverso, distribuído em

quase todos os continentes, com uma grande concentração em regiões da África, América Central e do Sul, bem como em áreas tropicais e subtropicais (Figura 03). Este grupo compreende aproximadamente 400 gêneros e 4.555 espécies, sendo que no Brasil, estão presentes 103 gêneros e 993 espécies, distribuídas em 13 subespécies e 26 variedades. No contexto do domínio fitogeográfico amazônico, são reconhecidos 316 nomes, e, ao restringir a análise ao estado do Pará, 170 nomes são aceitos (Tropicos, 2024). A ampla diversidade e a riqueza de espécies dessa família conferem um grande potencial para a exploração de compostos bioativos, incluindo os alcaloides, que desempenham papéis significativos em várias atividades biológicas (Bhadane *et al.*, 2018).

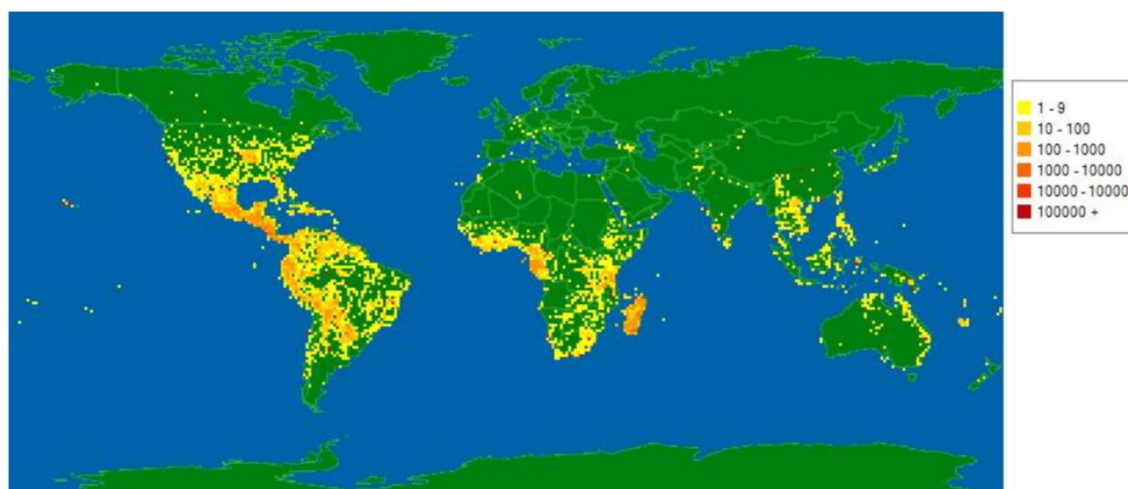


Figura 03 – Distribuição global da família Apocynaceae. Fonte: Tropicos, 2024.

Os representantes da família Apocynaceae apresentam uma diversidade de formas de vida, incluindo árvores, arbustos, ervas, trepadeiras, e seus substratos variam entre aquáticos, epífitos (que se sustentam em outras árvores), e rupícolas (que crescem em terrenos rochosos; Re flora, 2024). A importância econômica dessa família é significativa, abrangendo áreas como alimentação, indústria madeireira e medicina popular. Em termos terapêuticos, as plantas dessa família têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de uma variedade de condições, incluindo afecções parasitárias, doenças cardíacas, problemas dermatológicos, infecções e inflamações, doenças das vias aéreas superiores, doenças metabólicas e até com propriedades anticarcinogênicas (Silva, 2016). Este vasto leque de

aplicações destaca a relevância dessa família no contexto da medicina tradicional e da pesquisa farmacológica, com o potencial de contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos.

O marcador fitoquímico da família são os alcaloides indólicos monoterpênicos que possuem uma gama de atividades biológicas e potência variada quanto a sua toxicidade. Dentre as atividades biológicas atribuídas aos alcaloides dessa família destacam-se a atividade antiproliferativa, neuroprotetora e psicoativa, atividade biocida, anti-inflamatória, antitussígena, imunomoduladora, analgesia, antidiabética e hipoglicemiante, sobre o sistema cardiovascular, no sistema gastrointestinal (Taesotikul *et al.*, 1989; Sawyer *et al.*, 1995; Cimanga *et al.*, 1996; Mok *et al.*, 1998; Van Miert *et al.*, 2004; Baggio *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2013; Arai *et al.*, 2012; Dabhadkar; Zade, 2012; Mukhram *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2013; Ali Khan *et al.*, 2013; Zaima *et al.*, 2013; Terada *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2015; Dey *et al.*, 2017).

2.2.3 GÊNERO *Geissospermum*

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Asteranae Takht.

Ordem: Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl

Família: Apocynaceae Juss.

O gênero *Geissospermum* compreende atualmente cinco espécies taxonomicamente válidas: *Geissospermum argenteum* Woodson, *Geissospermum fuscum* Markgr., *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers, *Geissospermum reticulatum* A.H. Gentry e *Geissospermum sericeum* Miers. Todas as espécies são nativas do Brasil, mas não são endêmicas, ocorrendo também em outros países da América do Sul, como Peru, Colômbia e Venezuela. Sua distribuição abrange os domínios fitogeográficos da Amazônia (5 espécies), do Cerrado (1 espécie) e da Mata Atlântica (1 espécie; Reflora, 2024). As chaves de identificação para as espécies de *Geissospermum* baseiam-se principalmente nas características morfológicas das folhas. As *G. argenteum* e *G. sericeum* apresentam folhas estrigosas, pubescentes

em ambas as faces ou glabras na face adaxial e seríceas na face abaxial. Já as *G. fuscum*, *G. laeve* e *G. reticulatum* possuem folhas glabras em ambas as faces. Essas características, no entanto, devem ser complementadas com outros aspectos morfológicos, como a estrutura das flores, frutos e padrões de venação foliar, para uma identificação precisa e confiável (Reflora, 2024).

Uma característica marcante da família Apocynaceae, à qual o gênero *Geissospermum* pertence, é a presença de alcaloides do tipo indólico. Em 1877, o químico O. Hesse isolou a geissospermina (Quadro 1: 1), um alcaloide indólico, a partir de espécies desse gênero. A hidrólise da geissospermina resultou na formação de três outros alcaloides: apogeissosquizina (Quadro 1: 6), geissoschizina (Quadro 1: 8) e geissosquizolina (Quadro 1: 7; Rapoport *et al.*, 1958).

No século XIX, o farmacêutico Ezequiel dos Santos isolou, a partir de *G. vellosii* (sinônimo da espécie *Geissospermum laeve*), uma mistura de alcaloides que ele denominou pereirina. Na época, acreditava-se que essa mistura era um composto único, mas, com o avanço das técnicas de espectroscopia, foi possível identificar que a pereirina, na verdade, era composta majoritariamente por geissosquizolina, um alcaloide indólico. Posteriormente, a geissosquizolina foi isolada em outras espécies do gênero *Geissospermum*, confirmando sua relevância química e farmacológica (Almeida, 2009; Vital *et al.*, 2013; Silva, 2016).

Entre as atividades biológicas encontradas para o gênero *Geissospermum* podemos destacar a atividade antitumoral, onde o extrato etanólico obtido das cascas de *G. sericeum* apresentou efeito citotóxico frente a linhagem de câncer gástrico (ACP02), sendo mais seletivo para estas células do que a células renais (VERO) e hepáticas (HepG2; Bastos, 2017).

A atividade antiparasitária é uma característica amplamente documentada no gênero *Geissospermum*. Um estudo avaliou a atividade dos alcaloides indólicos e β -carbolínicos presentes nas cascas de *G. sericeum* contra cepas de *Plasmodium falciparum* sensíveis (T9-96) e resistentes à cloroquina (K1), os resultados demonstraram uma concentração inibitória média (CI₅₀) inferior a 40 μ M, sendo a flavopereirina o alcaloide mais promissor (Steele *et al.*, 2002).

Outro estudo avaliou a atividade antileishmania, contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, do extrato etanólico obtidos das cascas *G. vellosii* e *G. sericeum*, frações e flavopereirina. Dentre os alcaloides estudados, a flavopereirina

destacou-se por sua ação antileishmania. Nesse estudo ainda, foi demonstrado que o aumento do tempo de exposição dos macrófagos aos extratos das cascas de *G. sericeum* e *G. vellosii* reduziu a toxicidade dessas amostras, aumentando sua seletividade contra os parasitas, está relacionada a inibição da enzima Oligopeptidase B (Silva, 2016; Silva *et al.*, 2019).

Em relação a outros protozoários, o alcaloide O-demetilaspidospermina, isolado das cascas de *G. reticulatum*, demonstrou atividade antiparasitária frente a *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*. As CI_{50} foram de 7,7 $\mu\text{g/mL}$ e 41,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, reforçando o potencial terapêutico dos alcaloides desse gênero no combate a doenças parasitárias (Reina *et al.*, 2012).

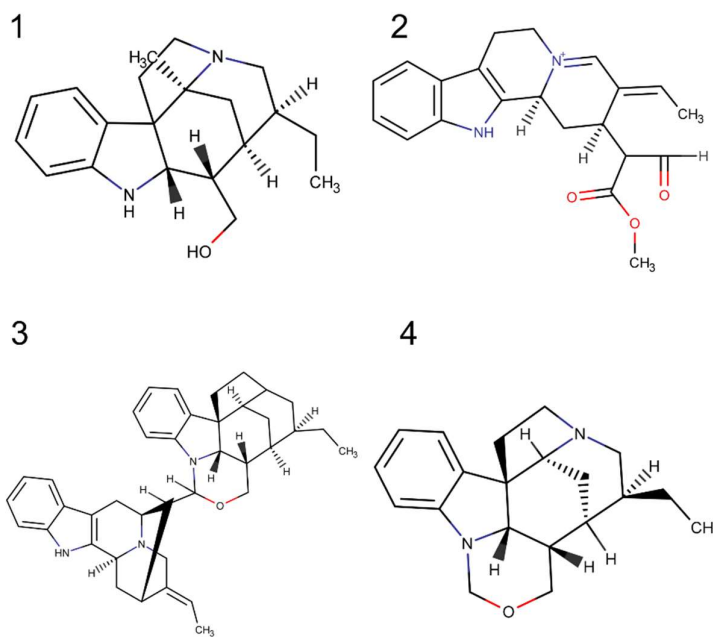


Figura 04 – Alguns exemplos de alcaloides isolados do gênero *Geissospermum*. Legenda: 1: pereirina; 2: 21-deidrogeissosquizina; 3: geissolosimina, e 4: Geissosquizona. Fonte: Autor, 2024.

2.2.3.4 *Geissospermum laeve* (Vell.) Miers

Classe: Equisetopsida C. Agardh

Subclasse: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superordem: Asteranae Takht.

Ordem: Gentianales Juss. ex Bercht. & J. Presl

Família: Apocynaceae Juss.

Gênero: *Geissospermum* Allemão

A espécie *Geissospermum laeve*, cujo basônimo é *Tabernaemontana laevis* Vell. e sinônimo *Geissospermum vellosii*, é uma árvore de grande porte, podendo atingir entre 2 e 30 metros de altura, embora também possa ocorrer na forma arbustiva. Seus ramos são glabros ou estrigosos, e as folha apresentam disposição alterna, são glabras em ambas as faces. A inflorescência é do tipo cimeira dípara, disposta em cachos, com flores actinomorfas de coloração bege e ausência de polinário. Os frutos são do tipo bacáceo, contendo sementes nuas. Além disso, a espécie produz látex esbranquiçado, uma característica marcante da família Apocynaceae (Reflora, 2024).

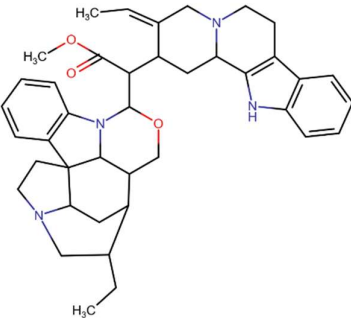
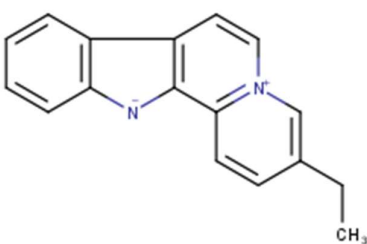
A espécie *G. laeve* está distribuída principalmente na América Central e do Sul, ocorrendo em países como Bolívia, Guiana Francesa, Peru e Brasil. No Brasil, sua distribuição abrange as regiões Norte (estados do Amazonas, Amapá e Pará), Nordeste (Bahia e Maranhão), Centro-Oeste (Distrito Federal) e Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro). Essa espécie está associada aos domínios fitogeográficos da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, demonstrando sua adaptação a diferentes ecossistemas (Reflora, 2024; Tropicos, 2024). Além de seu nome científico, *G. laeve* é conhecida por diversos nomes populares, como Pau-pereira (Rapoport *et al.*, 1958), pau-forquilha, camará-do-mato, camará-de-bilro e pau-de-pente (Pio-Corrêa, 1969).

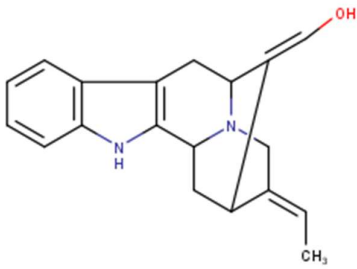
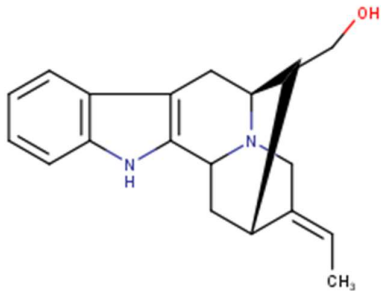
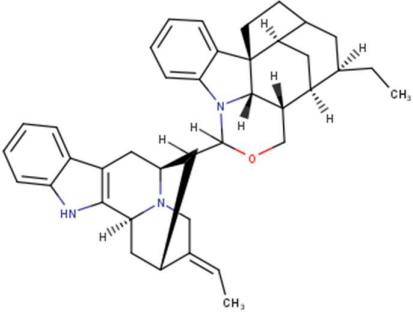
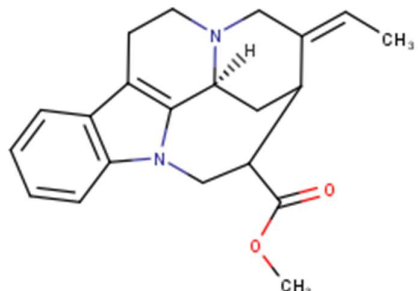
Vários são os usos populares atribuídos para a espécie, onde se destacam alegações contra febre intermitente (Almeida *et al.* 2009). Antiparasitário (Munõz *et al.* 2000; Oliveira *et al.* 2003). Antifebril (Rapoport *et al.* 1958; Werner *et al.*, 2009; Stalcup, 2020). Como estimulante sexual e nos distúrbios estomacais inferiores (Tavares, 2008; Brandão *et al.*, 2009; Lima *et al.* 2009; Werner *et al.*, 2009; Vital *et al.*, 2015; Stalcup, 2020). No tratamento de infecções fúngicas e antisséptico (Oliveira, 1883; Fenner *et al.* 2006). Erisipela, diarreias crônicas, hemorragias passivas e astenia (Almeida *et al.* 2009). Como preventivo e/ou tratamento de câncer de próstata (Camargo, 2011).

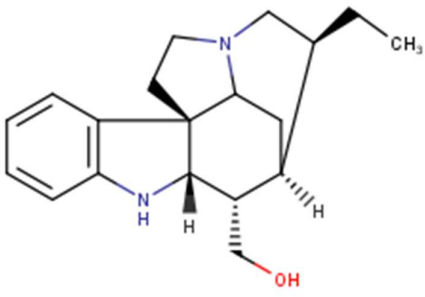
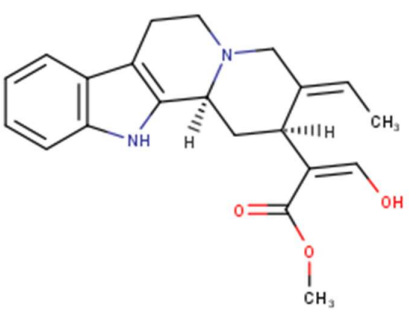
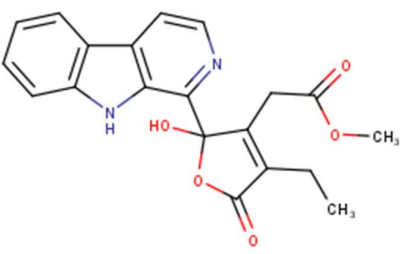
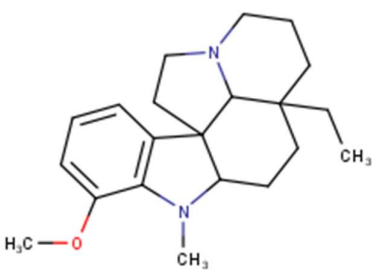
Das cascas da espécie foram isolados os alcaloides geissospermina (Quadro

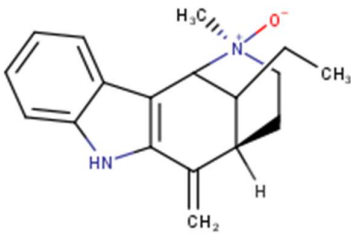
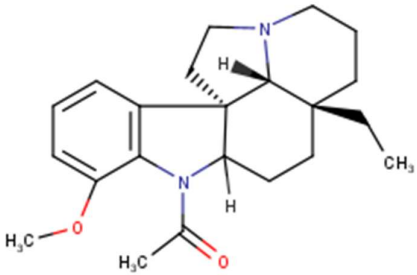
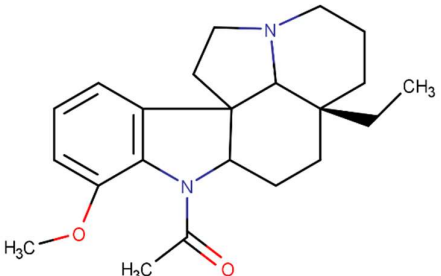
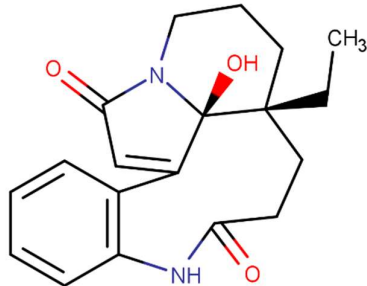
01: 1; Marion, 1952; Rapoport et al.1958), a flavopereirina (Quadro 01: 2; Hughes; Rapoport, 1958; Rapoport *et al.*, 1958; Wenkert; Kilzer, 1962), vellosimina, velosiminol e geissolosimina (Quadro 01: 3, 4, 5; Rapoport; Moore, 1962), apogeissoschizina, geissoschizolina, geissochizina (Quadro 01: 6, 7, 8; Rapoport *et al.*, 1958), geissovelina (Quadro 01: 9; Moore; Rapoport, 1973), 12-metoxi-1-metil aspidospermidina (Quadro 01: 10; Werner *et al.*, 2009), pausperidina A (Quadro 01: 11; Ishiyama; Matsumoto; Sekiguchi, 2005), aspidospermina e (+)-aspidospermina (Quadro 01: 12, 13; Dias, 2012), leuconolam, geissolaevina, O-metilgeissolaevina, 3',4',5',6'-tetraedrogeissospermina (Quadro 01: 14, 15, 16, 17; Ramos *et al.*, 2017) e o terpeno lupeol (Quadro 01: 18, Dias, 2012) e a lignina (+)-sesamina (Quadro 01: 19; Dias, 2012).

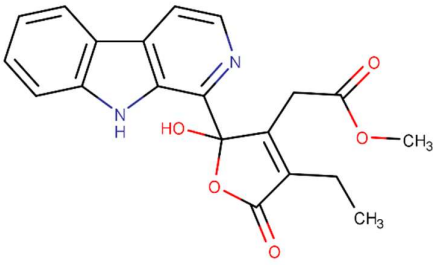
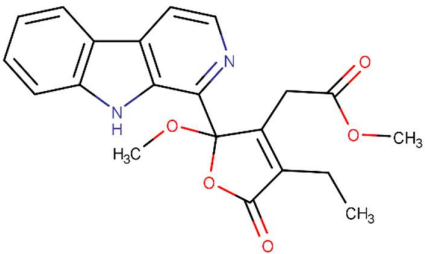
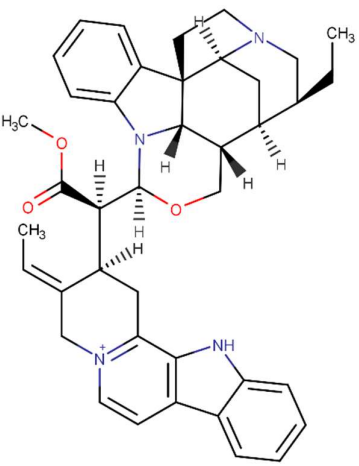
Quadro 01 – Metabólitos isolados de *Geissospermum laeve*

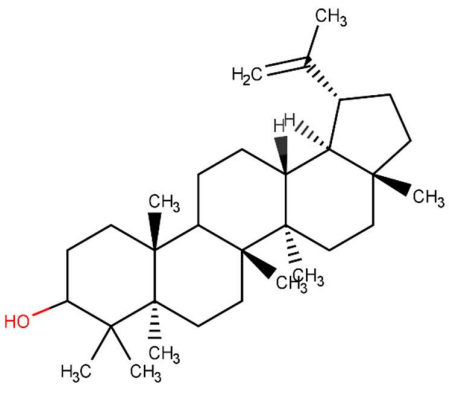
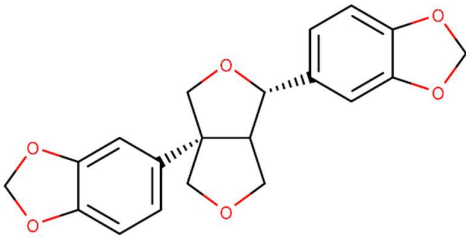
Compostos	MM (g/mol)	Fórmula	Referência
Alcaloides			
1) Geissospermina 	631,861	C ₄₀ H ₄₉ N ₄ O ₃	Marion, 1952; Rapoport <i>et al.</i> 1958.
2) Flavopereirina 	246,313	C ₁₇ H ₁₄ N ₂	Neil <i>et al.</i> , 1957; Rapoport <i>et al.</i> , 1957; Wenkert; Kilzer, 1962.
3) Vellosimina	292,382	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O	Rapoport; Moore, 1962.

			
4) Velosiminol 	294,398	$C_{19}H_{22}N_2O$	Rapoport; Moore, 1962.
5) Geissolosimina 	571,809	$C_{39}H_{45}N_3O$	Rapoport; Moore, 1962.
6) Apogeissoschizina 	336,435	$C_{21}H_{24}N_2O_2$	Rapoport <i>et al.</i> , 1958.
7) Geissoschizolina	298,43	$C_{19}H_{26}N_2O$	Rapoport <i>et al.</i> , 1958.

			
8) Geissochizina 	352,434	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	Rapoport <i>et al.</i> , 1958.
9) Geissovelina 	366,373	$C_{20}H_{18}N_2O_5$	Moore; Rapoport, 1973.
10) 12-metoxi-1-metil aspidospermidina 	326,484	$C_{21}H_{30}N_2O$	Werner <i>et al.</i> , 2009.
11) Pausperidina A	282,387	$C_{18}H_{22}N_2O$	Ishiyama; Matsumoto; Sekiguchi, 2005.

			
12) Aspidospermina 	354,494	$C_{22}H_{30}N_2O_2$	Dias, 2012.
13) (+)-Aspidospermina 	354,494	$C_{22}H_{30}N_2O_2$	Dias, 2012.
14) Leuconolam 	326,396	$C_{19}H_{22}N_2O_3$	Ramos <i>et al.</i> , 2017.
15) Geissolaevina	366,373	$C_{20}H_{18}N_2O_5$	Ramos <i>et al.</i> , 2017.

			
16) O-metilgeissolaevina 	380,4	$C_{21}H_{20}N_2O_5$	Ramos <i>et al.</i> , 2017.
17) 3',4',5',6'- tetrahydrogeissospermina 	629,824	$C_{40}H_{45}N_4O_3$	Ramos <i>et al.</i> , 2017.
Terpenos			
18) Lupeol	440,756	$C_{31}H_{52}O$	Dias, 2012.

			
Lignana			
19) (+)-sesamina 	354,358	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	Dias, 2012.

Legenda: MM, massa molar.

Um estudo demonstrou que o extrato da casca contendo alcaloides β -carbolfínicos inibiram o crescimento de células de câncer de próstata (linhagem LNCaP) *in vitro*, em concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$, o extrato ainda induziu a apoptose, com a concentração mais elevada (500 $\mu\text{g/mL}$) suprimindo 90% das células e causando parada do ciclo celular na fase sub-G1/G0. No mesmo estudo, em modelo *in vivo* com ratos machos, doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg do extrato, administrado por gavagem durante 6 semanas, foi observado a redução do crescimento do tumor em 80% e 75%, respectivamente (Bemis *et al.*, 2009).

Outro estudo evidenciou que o extrato hidroalcoólico das cascas inibiu o crescimento, *in vitro*, de células de câncer ovariano linhagens SHIN-3 (IC₅₀: 235 $\mu\text{g/mL}$), OVCAR-5 (IC₅₀: 180 $\mu\text{g/mL}$) e OVCAR-8 (IC₅₀: 185 $\mu\text{g/mL}$), através da indução da apoptose. Em modelo *in vivo*, a concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, o extrato exibiu um efeito antitumorigênico significativo, reforçando o potencial terapêutico desses compostos no tratamento de neoplasias (Yu; Chen, 2014).

A atividade antioxidante de alcaloides isolados de *G. laeve* foi amplamente

estudada. Utilizando o método do fosfomolibdênio, Dias (2012) demonstrou que a (+)-aspidospermina (60 µg) apresentou 123% de capacidade antioxidante em comparação com a rutina (60 µg), embora tenha sido inferior ao ácido ascórbico, com apenas 38,21% da capacidade deste. Através do método do ácido tiobarbitúrico-espécies reativas (TBARS), a (+)-aspidospermina, nas concentrações de 100, 500 e 1000 ppm, exibiu índices antioxidantes de 8,10%, 10,10% e 34,59%, respectivamente. Esses valores foram semelhantes aos do butilhidroxitolueno (BHT) (10,73%, 20,25% e 35,16%) e superiores aos do ácido ascórbico em sua concentração de 1000 ppm (3,67%, 14,87% e 21,73%).

Um estudo demonstrou que a fração diclorometano das cascas de *G. laeve* e o alcaloide isolado (+)-aspidospermina mostraram-se capazes de modular a atividade de enzimas antioxidantes, como peroxidase, catalase e superóxido dismutase (SOD), tendo seus resultados comparados aos do ácido ascórbico e o acetato de tocoferol (Dias, 2012).

O extrato metanólico das cascas do caule de *G. vellosii* demonstraram atividade inibitória sobre a acetilcolinesterase (AChE) isolados de enguia elétrica (CI₅₀: 2,9 µg/mL) e de camundongos *Swiss* albino (CI₅₀: 39,3 µg/mL). Também foi isolada a butirilcolinesterase (BChE) de cavalo, tendo a CI₅₀: 1,6 µg/mL, sendo a concentração inibitória nesta enzima inferior à obtida na AChE. Nestes ensaios foram usadas diferentes concentrações, podendo ser verificado que a resposta inibitória é concentração dependente (Lima *et al.*, 2009).

O extrato etanólico e a partição (água:hexano) apresentaram atividades antinociceptiva, antiedematogênica e anti-hiperalgésica em ratos *Wistar*, reduzindo a constrição abdominal com efeito analgésico periférico, aparentemente sem ativação do sistema opioide. A partição também exibiu atividade anti-inflamatória, com redução do edema entre a 2ª e 3ª horas, e efeito anti-hiperalgésico, com pico de ação em 2 horas e início em 30 minutos após administração da partição (Lima *et al.*, 2016).

O extrato metanólico obtido das cascas mostrou-se altamente ativo contra cepas de *Plasmodium falciparum* sensíveis à cloroquina (D10; CI₅₀ de 2,2 µg/mL; Mbeunkui *et al.*, 2012). Além disso, o extrato etanólico, a fração de neutros e a fração de alcaloides apresentaram atividade contra a cepa resistente W2, com CI₅₀ de 11,13 µg/mL, 8,67 µg/mL e 2,69 µg/mL, respectivamente (Brandão, 2012).

Em camundongos infectados com *P. berghei* NK65i tratados por 3 dias com o extrato das cascas de *G. vellosii* por via intraperitoneal, observou-se que a redução da parasitemia foi dose dependente, tendo um maior redução da parasitemia para a dose de 500 mg/kg (75%), seguido de 250 mg/Kg (61%) e 125 mg/kg (53%; Muñoz *et al.*, 2000). O extrato aquoso das cascas inibiu 35% do crescimento de *P. falciparum* resistente à cloroquina (cepa W2) em uma concentração de 23 mg/kg (Bertania *et al.*, 2005).

Alcaloides também demonstraram atividade antiplasmódica contra *P. falciparum*. A flavopereirina apresentou atividade frente a cepa resistente a cloroquina K1 (CI₅₀ de 11,53 µM) e 1,83 µM (T9-96). O derivado da flavopereirina, a 5,6-dihidroflavopereirina, foi ativa contra o parasito resistente a mefloquina (F32; CI₅₀ = 3,02 µM Muñoz *et al.*, 2000; Steele *et al.*, 2002). Os alcaloides geissolosimina (CI₅₀ = 0,96 µM), geissospermina (CI₅₀ = 5,02 µM), geissoschizolina (CI₅₀ = 13,93 µM), geissoschizona (CI₅₀ = 10,29 µM) e vellosiminol (CI₅₀ = 157 µM) foram ativos frente a cepa sensível D10 de *P. falciparum* (Mbeunkui *et al.*, 2012).

A atividade antimicrobiana de *G. laeve* apresenta resultados variados na literatura. Utilizando o teste de disco-difusão, o extrato etanólico apresentou halo de inibição (12,59 mm) e a fração alcaloídica (13,72 mm) frente a *S. aureus*, enquanto o extrato etanólico exibiu um halo de 13,03 mm contra *P. aeruginosa*, sem atividade observada para a fração alcaloídica (Brandão, 2012). Frente a cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA), o extrato etanólico das cascas de *Geissospermum vellosii* promoveu a formação de halos de inibição de 9 mm (250 µg/mL) e 10 mm (500 µg/mL), com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 125 µg/mL. Além disso, o extrato demonstrou efeito sinérgico quando coadministrado, *in vitro*, com antimicrobianos convencionais como ciprofloxacina, clindamicina e vancomicina (Saraiva *et al.*, 2012). No entanto, em outro estudo não foram observados halos de inibição para as bactérias testadas pelo mesmo método, sendo atribuindo esse resultado à natureza lipofílica das amostras, que pode prejudicar a difusão no meio sólido (Dias, 2012). Por outro lado, ao utilizar o método bioautográfico, a fração diclorometano inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis* e *S. typhimurium*, enquanto a (+)-aspidospermina mostrou atividade contra *S. epidermidis* e *S. typhimurium* (Dias, 2021).

O extrato etanólico obtido das cascas *G. vellosii* foi submetido a avaliação da

atividade antimicrobiana utilizando o método da microdiluição determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM). Nas concentrações iguais a CIM e superiores, foi realizado o semeio em agar dos poços tratados e determinados a concentração bactericida mínima (CBM). Na avaliação da CIM, o fracionamento do extrato (CIM de $>125 \mu\text{g/mL}$) levou a obtenção de uma fração de alcaloides ($<31,25 \mu\text{g/mL}$) mais ativa contra *S. aureus*. No entanto, os valores de CBM foram mais elevados, com valores de $>500 \mu\text{g/mL}$ para o extrato e $>250 \mu\text{g/mL}$ para a fração alcaloídica. Ao se relacionar os dois resultados, pode-se sugerir que o efeito da espécie e bacteriostático (Brandão, 2012). Como a fração de alcaloides apresentou maior atividade em comparação ao extrato etanólico, pode-se sugerir que a atividade antiestafilocócica esteja relacionada, predominantemente, à presença desses compostos. Dessa forma, o fracionamento revelou-se uma estratégia mais eficaz em termos de atividade antibacteriana e, por isso, foi o caminho adotado neste trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar se o fracionamento do extrato de *G. laeve* impacta na atividade antibacteriana e no efeito sinérgico em associação com benzilpenicilina (BZP) ou imipinem (IMP).

3.2 Específicos

- Realizar estudos fitoquímicos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato, fração e isolado frente a cepas sensíveis e resistentes;
- Avaliar o efeito sinérgico do extrato, fração e isolado com antimicrobianos convencionais;
- Investigar o possível mecanismos de ação *in silico*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.2 Material

4.2.1 EQUIPAMENTOS

Agitador com plataforma, New Brunswick Scientific (Modelo Innova 2100);
Autoclave (Phoenix);
Balança analítica (Gehaka, modelo AG 200);
Balança analítica (Gehaka, modelo BK 600);
Balança Analítica (Mettler Toledo, modelo AB204);
Balança semi-analítica (Núcleo);
Banho de Ultrassom (Maxiclean);
Câmara de fluxo laminar (Esco);
Câmara de ultravioleta de 254 e 365 nm (Warning);
Capela de exaustão (Quimis);
Chapa aquecedora e agitadora (Corning);
Chapa de aquecimento (Quimis);
Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Alliance e2695 (Waters) equipado com amostrador automático (autosampler) e detector de arranjo de fotodiodos (DAD);
Dessecadores de vidros;
Destilador de água (Marte);
Estufa bacteriológica (Solab);
Evaporador rotativo (Fisoton);
Geladeira (Cônsul);
Leitora de microplacas (ELISA Stat Fax®, modelo 2100);
Medidor de pH (Marconi, modelo PA 200);
Micropipeta Transferpette (Brand, 8 canais, eletrônica, vol. ajustável de 10-200 μL);
Micropipetas Eppendorf, vol. ajustável de 100 μL - 1 mL;
Micropipetas Eppendorf, vol. ajustável de 2 μL - 20 μL ;
Moinho de facas (Marconi);

Sistema de filtração de água Millipores, Milli-Q Plus;
Turbidímetro (Densimat);
Ultrassom (Thornton, modelo T14).
Vitek 2 compact (BioMérieux)
Maldi biotyper sirius (Bruker)
Espectrofotômetro de Infravermelho (Perkin Elmer Precisely, modelo Spectrum One FT-IR Spectrometer)
Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker 400 MHz (modelo Ascend 400)

4.2.2 SOLVENTES, FASES ESTACIONÁRIAS E DEMAIS REAGENTES

Álcool Metílico (Exôdo)
Cloreto de Metileno (Exôdo)
Dimetilsulfóxido (Exôdo)
Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido, Sigma-Aldrich)

4.2.3 MATERIAL DE PLÁSTICO, METAIS E VIDRARIAS

Alça calibrada 10µL (LabPlast);
Balão de fundo chato de 100, 250 e 500 mL (Vidrolabor);
Bastão de vidro;
Béqueres de 10, 50, 100, 500 e 1000 mL (longlass);
Cuba cromatográfica;
Cubas de vidro (Pirex);
Erlenmeyer de 50, 100, 250 e 500 mL (longlass);
Espátulas de metal;
Frascos plásticos com tampa (Sigma Chemical Company);
Funis de separação de 250 mL e 2000 mL (longlass);
Chapa aquecedora (;
Membrana filtrante Millipore (Millex F6 0,2 mm);
Papel de filtro MN 618;

Paquímetro;
Pinça;
Pincel;
Ponteiras tipo Gilson de 10, 50, 100, 500 e 1000 µL;
Pipetas de Pasteur de vidro (VWR);
Pipetas graduadas de 2, 5, e 10 mL;
Pipetas volumétricas de 10 e 20 mL;
Placas com 96 poços de fundo chato (TTP);
Placas cromatográficas de vidro 10 x 5 e 10 x 10cm;
Placas de Petri descartável 90X15 cm (J. Prolab);
Ponteiras de 10 a 1000µl e de 20 a 200 µl;
Provetas de vidro 50, 100 500 mL (Vidrolabor);
Swab (J. Prolab);
Tubo capilar;
Vidro de relógio;
Provetas 5, 20, 50, 100, 500 e 1000 mL (Biocentrix);
Vial para CLAE, 2 mL.

4.2.4 MEIO DE CULTURA E ENRIQUECIMENTO

Ágar e caldo Mueller-Hinton, ágar Nutriente, ágar TSI (do inglês, *Triple Sugar Iron*), CHROMagar™ orientation, foram preparados seguindo padrão do fabricante pelo Centro de Esterilização da Seção de Bacteriologia do Instituto Evandro Chagas e requeridos previamente antes do uso.

4.2.5 PREPARO DE REVELADORES

4.2.5.1 Reagente de Dragendorff

Para a análise em cromatografia em camada delgada foi utilizado o seguinte reativo: Solução A foi obtida através da solubilização de 0,850g de subnitrato de bismuto em 10,0 mL de ácido acético e 40,0 mL de água destilada, e para a Solução

B utilizaram-se 8,0g de iodeto de potássio dissolvido em 20,0 mL de água destilada. As soluções foram misturadas (1:1), resultando em uma solução estoque. Para pulverização nas placas cromatográficas diluiu-se 2,0 mL de solução estoque com 4,0 mL de ácido acético glacial e 20,0 mL de água destilada (Wagner; Bladt, 1996).

4.2.6 PREPARO DE MEIOS PARA O ENSAIO ANTIMICROBIANO

Os meios para análise foram preparados segundo as notas técnicas dos fabricantes pelo Setor de Esterilização do Seção de Bacteriologia (SEBAC) do Instituto Evandro Chagas (IEC) e disponibilizados mediante a solicitação previas.

4.2.7 MATERIAL BIOLÓGICO

As cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) e os isolados resistentes advêm da bacterioteca do Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas II, do Instituto Evandro Chagas e estão descritas no quadro abaixo:

Quadro 02 – Microrganismos utilizados nos ensaios biológicos

Microrganismo	Referência	Característica
Controle de qualidade		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Sensível
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Sensível
Determinação do CIM e estudo de sinergismo		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300	Resistente a Meticilina
<i>Escherichia coli</i>	IEC-BAC 58932*	Coprodutora de NDM-KPC

Legenda: IEC: Instituto Evandro Chagas; BAC: bacterióteca. *: isolado clínico.

4.2.8 MATERIAL VEGETAL

As cascas do tronco de *Geissospermum laeve* foram coletadas no primeiro semestre de 2010 no Ramal do Madeireiro, localizado na Rodovia PA-150, no município de Moju, Pará. A coleta e identificação do material vegetal foram

realizadas pela Dra. Márlia Regina Ferreira Coelho, pesquisadora do Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém, PA). Uma exsicata foi depositada no herbário do Museu Emílio Goeldi. Além disso, o registro da coleta foi feito no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), com a família obtendo o número de registro A2C3188.

4.3 Métodos

4.3.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.3.1.1 Obtenção do extrato, fração e isolamento do alcaloide

As cascas coletadas foram higienizadas e secas em estufa de circulação de ar a 40°C. Após 20 dias, foram trituradas em moinho de facas, e o pó resultante foi armazenado em frascos previamente esterilizados até o momento do uso. Para a obtenção do extrato (EEGL): 50 g do pó das cascas foram submetidos à maceração exaustiva (1:10) com álcool etílico 95° GL. O solvente foi coletado e renovado a cada 7 dias. Após 21 dias, 1,5 L da solução extrativa foi concentrado em evaporador rotativo a baixa pressão.

Para obtenção da fração (FAGL) e do precipitado (GN4MC) seguiu-se o protocolo estabelecido por Brandão (2012), conforme esquematizado na Figura 05. Inicialmente, 25 g do pó das cascas foram tratados com 100 mL de ácido clorídrico 1N. A solução filtrada foi transferida para um funil de separação, onde foi extraída com 100 mL de cloreto de metileno (3×), resultando em uma fração orgânica (fração de neutros). Em seguida, a fração aquosa ácida restante foi basificada até pH 9-10, promovendo a precipitação do alcaloide (GN4MC). A fração aquosa basificada foi então extraída com cloreto de metileno (3×), gerando a fração de alcaloides (FAGL).

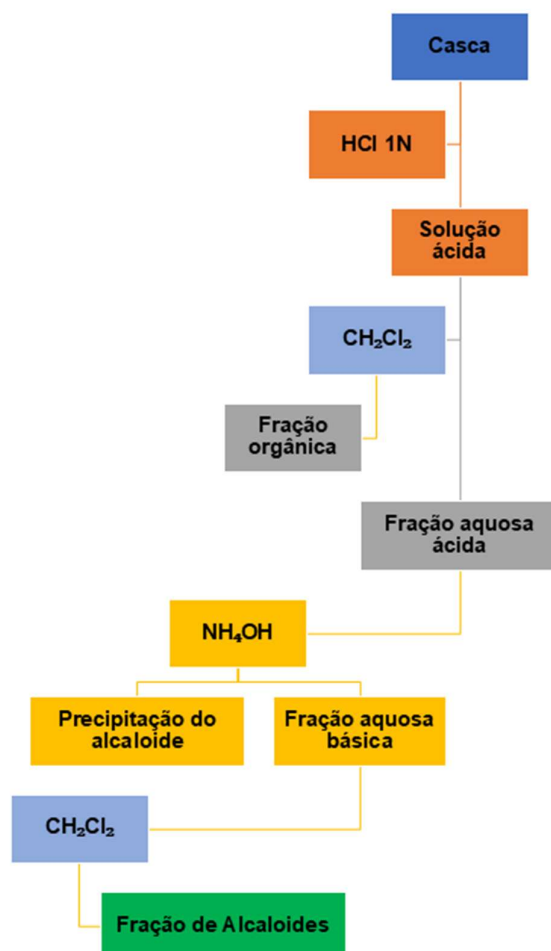


Figura 05 – Esquema para obtenção do alcaloide isolado por meio de partição líquido-líquido.

4.3.1.1.1 Caracterização do extrato e fração e precipitado

O extrato, a fração e o precipitado foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) realizado no cromatógrafo equipado com amostrador automático (*autosampler*) e detector de arranjo de fotodiodos (DAD). 1 mg da amostra foi solubilizado em 1 mL de metanol. O volume de amostra injetado foi de 20 μ L e a temperatura da coluna foi mantida a 40° C. A fase móvel constituiu-se de uma mistura de H₂O ultrapura e Acetonitrila grau CLAE (ACN; Merck). O gradiente exploratório linear de eluição usado foi de H₂O-ACN, onde as concentrações desses solventes variaram de 95:5 a 0:100 em 60min, para confirmação que não existia outros compostos em mistura. O fluxo do eluente foi de 1mL/min. Os cromatogramas foram obtidos em 3 comprimentos de onda 340 nm, 254 nm e 212 nm.

Em adição, para o precipitado foram feitas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C onde, 30 mg das amostras, onde ele foi solubilizado em metanol de grau deuterado (CD_3OD) e o tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Foi obtido também o espectro de massa por ionização por *spray* de elétrons (do inglês *electrospray ionization*, ESI) que se utilizada de alta voltagem em amostra líquida, provendo sua ionização. As voltagens capilar e de cone foram 3 e 30-35, respectivamente, com a energia de colisão de 20-32 com o elétron *spray* no modo positivo. Por fim, o precipitado também foi submetido a análise de infravermelho com transformada de Fourier, onde o precipitado foi misturado a brometo de potássio (KBr) e então foi prensado até a formação de uma partilha, o KBr também foi prensado isoladamente para servi de controle, sendo realizado 20 varreduras com resolução de 2 cm^{-1} na faixa espectral de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

4.3.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.3.2.1 Atividade antimicrobiana

Para esse estudo serão utilizadas as diretrizes, pontos de corte e metodologia de testes estabelecidas, por consenso, pelo Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST) em ressonância com *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Foram utilizadas duas cepas de *Staphylococcus aureus* (Gram-positivas) e duas cepas de *Escherichia coli* (Gram-negativas fermentadoras). As cepas de *S. aureus* foram descongeladas, e 10 μL de cada uma foi transferido para caldo Mueller Hinton (MH). Da mesma forma, 10 μL das cepas de *E. coli* foram inoculadas em caldo MH. Todas as culturas foram incubadas a $35^\circ\text{C}\pm 2^\circ$ em estufa bacteriológica por 8 horas para obtenção da fase Log. Após esse período, as bactérias foram semeadas, com auxílio de alça bacteriológica, em meio *CHROMagar™ Orientation* e novamente incubadas a $35^\circ\text{C}\pm 2^\circ$. Após o crescimento no *CHROMagar™*, uma colônia de cada cepa foi transferida para ágar nutriente para confirmação da

identificação dos microrganismos por meio de método automatizado.

Todos os microrganismos foram identificados utilizando o sistema automatizado MALDI-TOF™ (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*) da série *Biotyper sirius System*. O método direto foi empregado, no qual as cepas foram semeadas por estria em ágar nutriente para obtenção de colônias isoladas e incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por $20\text{h} \pm 2$. As colônias isoladas foram transferidas para uma placa de 96 ranhuras em aço inoxidável. Em seguida, foram aplicados 0,1 µL de matriz HCCA (ácido 4-hidroxi- α -cianocinâmico). Após a secagem, a placa foi submetida à leitura no equipamento, previamente calibrado com o padrão BTS (do inglês, *Bacterial Test Standard*).

4.3.2.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos controles - TSAC

Para a realização do teste de susceptibilidade antimicrobiana (TSAC), uma suspensão bacteriana foi preparada em solução salina a 0,85%, ajustada para a densidade de 0,5 na escala de McFarland ($\approx 1 \times 10^8$ UFC/mL). Esse inóculo foi diluído para uso em placas de 96 poços, resultando em uma concentração final de $\approx 5 \times 10^6$ UFC/mL. Em cada poço das placas de 96 poços, foram depositados 190 µL de caldo MH contendo o inóculo bacteriano. Em seguida, foram adicionados 10 µL do controle positivo: benzilpenicilina, nas concentrações de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,015625 µg/mL, para as cepas de *Staphylococcus aureus*, e imipeném, nas concentrações de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,015625 µg/mL, para as cepas de *Escherichia coli*. O ensaio foi realizado em triplicata, com três repetições independentes (Figura 6).

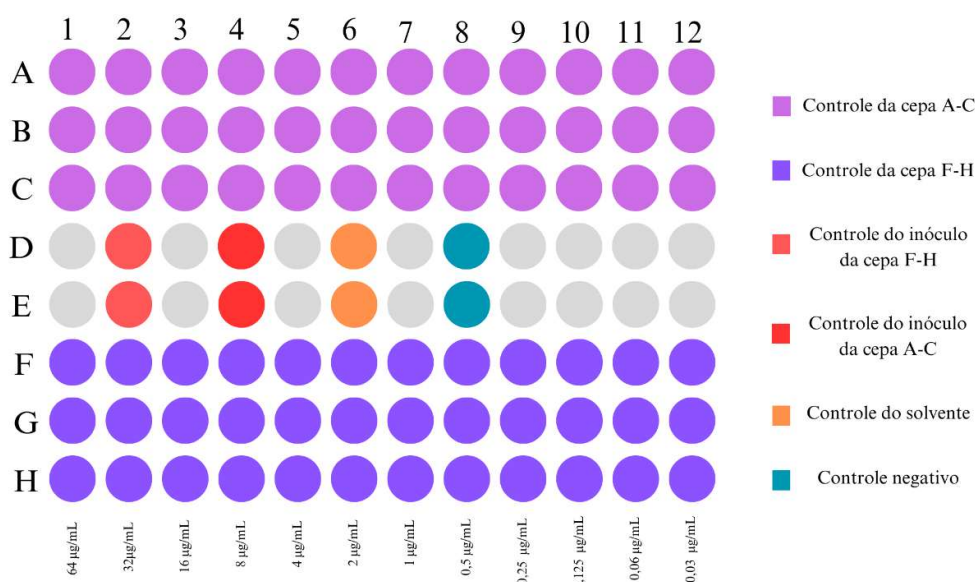


Figura 06 – Esquema da placa de 96 poços para o TSAC.

Legenda: Controle negativo: somente o caldo MH; controle do inóculo: o caldo MH com a adição dos microrganismos; controle do solvente: caldo MH com a adição dos microrganismos e DMSO à 5%. Os poços de A-C foram alocadas as cepas resistentes, enquanto que de F-H as cepas sensíveis. O controle do solvente consiste em DMSO à 5%.

4.3.2.3 Concentração inibitória mínima - CIM

A produção do inóculo foi realizada conforme descrito no item 4.3.2.2. Em placas de 96 poços, foram depositados 190 µL de caldo MH contendo o inóculo bacteriano. Em seguida, foram adicionados 10 µL das amostras em diluições que variaram de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 µg/mL, totalizando 200 µL por poço. A placa de controle positivo foi preparada separadamente, conforme descrito no item 4.3.2.2 utilizando a benzilpenicilina como controle positivo para a *S. aureus* e o imipenem para *E. coli*. Como controle do inóculo, foram utilizados três poços contendo 10 µL da suspensão bacteriana + 190 µL de caldo MH e outros três poços com 190 µL de caldo MH + 10 µL de DMSO à 5% (dimetilsulfóxido: água v/v) como controle do solvente, outros três poços contendo 200 µL de caldo MH foi usado como controle do meio. Após a preparação, as placas foram incubadas a 35°C±2° por 20h± 2 (Figura 7, Eloff, 1998; CLSI, 2018; BRCST, 2023).

Após o período de incubação, 10 µL de resazurina a 0,3% (p/v) foram adicionados a cada poço. A resazurina, inicialmente azul, torna-se vermelha quando metabolizada pelas células viáveis. As placas foram então incubadas por mais 2h e

lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 540 nm e 700 nm (Eloff, 1998; CLSI, 2018; BrCAST, 2023).).

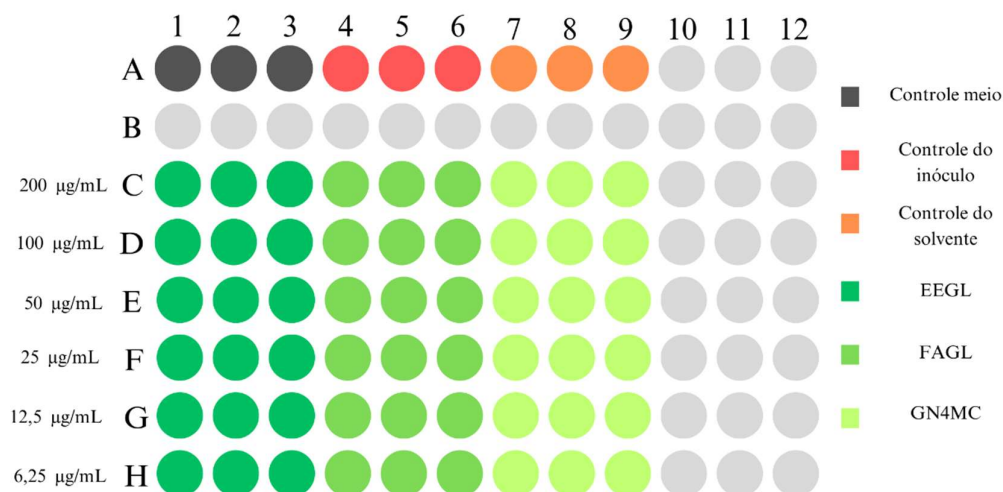


Figura 07 – Esquema da placa de 96 poços para avaliação da atividade antimicrobiana. Legenda: Controle negativo: somente o caldo MH; controle do inóculo: o caldo MH com a adição dos microrganismos; controle do solvente: caldo MH com a adição dos microrganismos e DMSO à 5%.

4.3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO PELO MÉTODO DO TABULEIRO DE XADREZ (*CHECKERBOARD*)

Para a avaliação do efeito sinérgico, utilizou-se o protocolo descrito por Nogueira (2019) com adaptações. Após a determinação das CIMs do antimicrobiano e das amostras, seguiram-se os passos estabelecidos no teste de CIM (item 4.3.2.3). A partir da CIM encontrada para os antimicrobianos, do EEGL, da FAGL e do GN4MC foi realizada uma diluição de 128×. Foi utilizado um esquema de 8 × 8 poços, no qual as fileiras de 1 a 8 receberam o antimicrobiano em concentrações decrescentes (32 a 0,25 µg/mL), enquanto os poços de A a H receberam as diluições do EEGL, FAGL e GN4MC. Para o EEGL e o GN4MC, foram adotadas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625 µg/mL, e para a fração de alcaloides, concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 µg/mL (Figura 08). A partir da correlação entre a CIM do antimicrobiano isolado, a CIM do alcaloide isolado e a CIM da combinação, foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF).

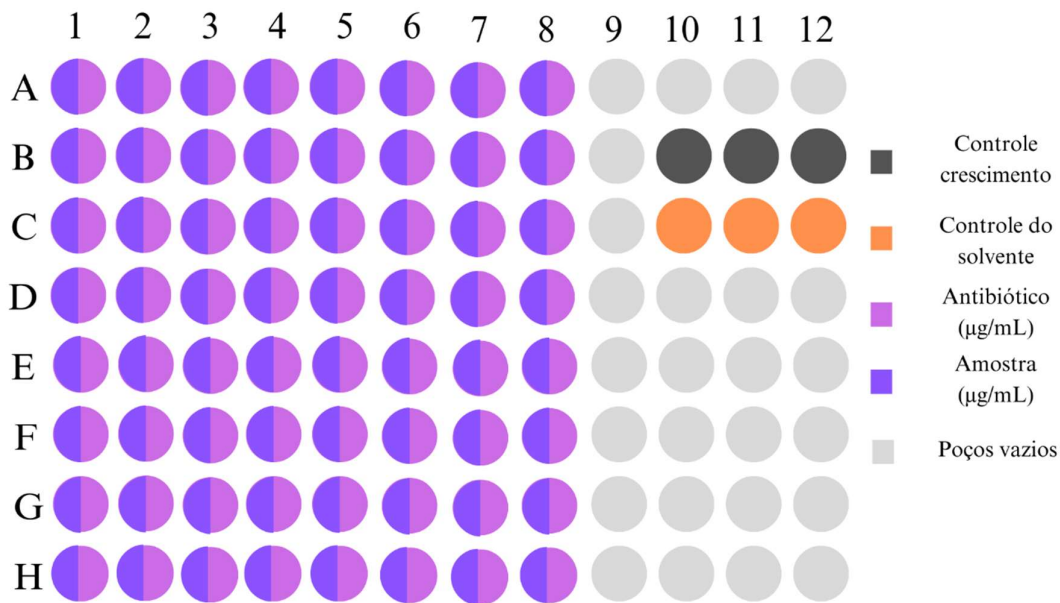


Figura 08 – Esquema de distribuição de amostras adotado no ensaio do tabuleiro de xadrez. Legenda: 1-8- concentrações decrescentes do antibiótico; A a G: concentrações decrescentes das amostras testes. Fonte: Autor, 2025.

$$ICIF = \frac{CIM \text{ do alcaloide combinado}}{CIM \text{ do alcaloide isolado}} + \frac{CIM \text{ do antimicrobiano combinado}}{CIM \text{ do antimicrobiano isolado}}$$

(1)

A partir do ICIF as interações foram avaliadas seguindo o quadro abaixo:

Quadro 03 – Interações a partir do ICIF obtido

Interação	ICIF
Sinergismo potenciação	≤ 0,5
Sinergismo adição	0,5 < CIF ≤ 1
Indiferente	1 < CIF ≤ 2
Antagonismo	> 2

Fonte: Adaptado de Kumar *et al.*, 2009.

4.3.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME

O teste foi adaptado de Christensen e colaboradores (1982), as cepas foram incubadas em Ágar Nutriente por 24h à 35°C±2°. Após esse período, a placa de 96

foi prepara com a adição 180 μ L de caldo TSB, onde foram adicionados, 20 μ L da suspensão bacteriana das amostras em solução salina 0,85% para adesão na placa e novamente incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ por 24h. Após a incubação, o meio foi retirado e os poços foram lavados 3 $\times$ com solução salina 0,85%, para promover a remoção do material não aderido. O biofilme foi fixado com 200 μ L de metanol P.A por 15 min, após esse período, o metanol foi retirado e placa foi seca em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de violeta genciana a 0,25% durante 3 min. Em seguida, o excesso de corante foi removido com três lavagens com solução salina a 0,85% e deixado secar à temperatura ambiente. Após secar, para a leitura da densidade óptica (DO), o corante residual do biofilme foi diluído com uma solução de ácido acético a 33% (v:v) e, então, lido em um leitor de multiplacas a 630 nm. Sendo, então classificado como não aderentes (quando a $\text{DO} \leq \text{Doc}$; densidade óptica do controle negativo), fraca a moderadamente aderentes ($\text{DOc} < \text{DO} \leq 2 \times \text{DOc}$) e fortemente aderente ($2 \times \text{DOc} < \text{DO}$; Christensen *et al.*, 1985; Mariz, 2018).

4.3.5 AVALIAÇÃO *IN SILICO*

Para a realização dos estudos *in silico* as moléculas foram desenhadas em MarvinSketch™, otimizadas em Avogrado™ e então submetida a avaliação do servidor ADMETLab™ 3.0 e PreADMET para as predições físico-químicas, farmacocinéticas, toxicológicas e *drug-likeness*, onde foi avaliada a biodisponibilidade que levou em consideração a Regra de Lipinski ou "Regra dos Cinco" onde um bom candidato a fármaco possuirá (1) número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; (2) número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; (3) massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol (4) coeficiente de partição octanol-água (log P) menor ou igual a 5; (6) área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å (Lipinski *et al.*, 1997; Lipinski, 2004; Verber *et al.*, 2002).

Nos estudos farmacocinéticos avaliou-se a absorção intestinal (*Human Intestinal Absorption* = HIA), onde foram considerados os parâmetros de HIA 0-20% (baixa absorção), 20-70% (moderada absorção), >70% (elevada absorção); permeabilidade em células Caco2 (Yee, 1997) e MDCK onde as moléculas foram consideradas de alta permeabilidade em valores >70 nm/sec, de média permeabilidade 4-70 nm/sec e de baixa permeabilidade <4 nm/sec (Yazdanian *et al.*,

1998). Para análise da distribuição dessas substâncias, os referenciais foram >90% ligado fortemente à albumina e <90% ligação moderada a fraca à albumina. Para a capacidade ou não de atravessar a barreira hematoencefálica, empregaram-se os seguintes critérios: atravessa livremente a BHE >2,0, atravessa de forma moderada a BHE valores entre 2,0-0,1 e atravessa de forma reduzida ou não atravessa <0,1 (Ajay, *et al.*, 1999).

Para a ancoragem molecular as proteínas foram recuperadas do domínio RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) e otimizadas no servidor APBS (<https://server.poissonboltzmann.org/>) para remoção dos componentes co-cristalografados, adição dos hidrogênios polares e cargas do campo de força CHARMM em um estado protonado em pH 7,0. A ancoragem foi realizada utilizando como alvos a PBP2a (PBP alterada; PDB: 4CJN) expressa por MRSA; a enzimas β -lactamases KPC-2 (carbapenemase da classe A; PDB: 5UJ3) e NDM-1 (carbapenemase de classe B; PDB: 5ZGE) expressas pela *E. coli*, além os genes que participam do *quorum sensing* (QS) para avaliação da inibição do biofilme *LuxS* (PDB: 2FQT) e o domínio AgrA-LytTR (PDB: 4G4K), então foi realizada por meio do servidor DockThor™, a ancoragem foi realizada no sistema de *virtual screening* tendo as seguintes coordenadas 4CJN (XYZ 8, -8, -67), 5UJ3 (XYZ 19, 13, 12), 5ZGE (XYZ -8, -45, 103), 2FQT (XYZ -19, 27, -11) e 4G4K (XYZ 24, 24, 43). As visualizações das interações foram feitas com os servidores Discovery Studio™ e PyMOL™.

5 RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo Fitoquímico

O extrato (EEGL, 400 mg, 2%) e a fração alcaloídica (FAGL 50 mg, 0,2%), e após a partição ácido:base durante a obtenção da FAGL, um pó amórfico de cor branco-esverdeado foi obtido por precipitação em pH 9-10 (68mg, 0,27%), as três amostras foram submetidas a cromatografia em camada delgada (CCD), para obtenção do perfil cromatográfico. Em CCD podemos observar sinais da presença de compostos fluorescentes no EEGL e na FAGL, durante a incidência de luz-ultravioleta no comprimento de onda de 365nm (Figura 09.1), enquanto que, no isolado, não é perceptível a fluorescência que é característica de alcaloides, e após o uso do reagente de *Dragendorff* (Figura 09.2), temos o aparecimento de uma mancha alaranjada pela reação com a porção amina.

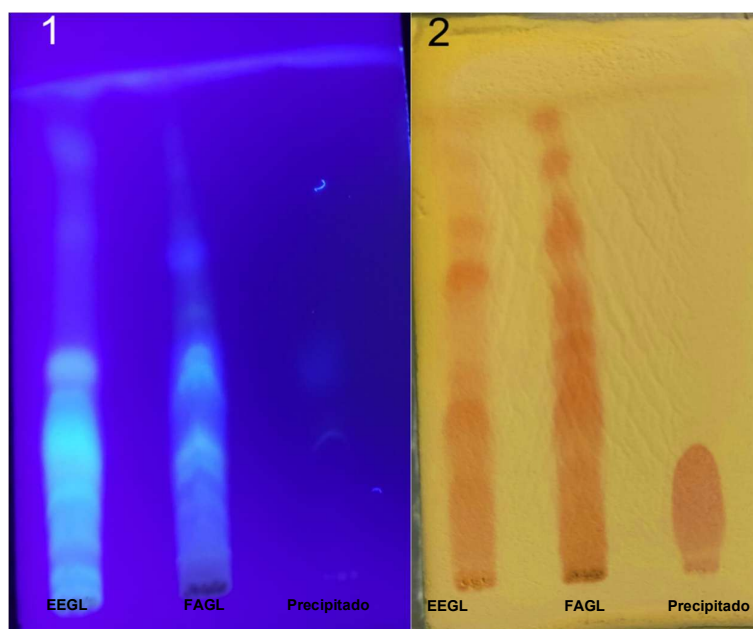


Figura 09 – Perfil em CCD do extrato, fração alcaloídica e isolado.

Legenda: Fase móvel: Clorofórmio: metanol: hidróxido de amônia (85:15:0,2 [% , v/v]). 1: perfil observado sobre a luz-ultravioleta em 365nm. 2: perfil revelado com *Dragendorff*. EEGL: extrato; FAGL: fração.

Para buscar elucidar melhor a composição do EEGL e da FAGL, foram realizadas análises via CLAE-DAD, entretanto, não foi possível padronizar a análise para o EEGL. Análise por CLAE-DAD da fração mostrou constituintes referentes aos picos com Tr (tempo de retenção) = 12,16 min. (absorbância UV λ 205, 243, 295 nm); Tr: 14,95 (λ 203 e 248 nm); e os picos com Tr = 17,44; Tr = 21,04; Tr = 22,07; Tr = 25,74 e Tr = 27, 75 apresentaram λ aproximadas 220-223 e 261-270 nm. Os picos de absorbância observados em torno de 203 nm, 220 nm, 248 nm e 270 nm são característicos de alcaloides indólicos. As absorbâncias próximas a 203 nm e 220 nm sugerem a presença de estruturas aromáticas simples ou sistemas conjugados com duplas ligações, que podem estar associados ao anel indólico. Já os picos em 248 nm e 270 nm estão relacionados a substâncias que contêm grupos carbonila, amina ou nitrogênio heterocíclico, o que reforça a caracterização do núcleo indólico (Brandão, 2012; Silva, 2016; Aigotti *et al.*, 2022). No caso do composto identificado no pico com Tr de 12,16 minutos, observa-se uma absorbância característica em 295 nm, que é típica de alcaloides β -carbonílicos. Essa absorbância está associada à conjugação entre o sistema indólico e o sistema piridínico, confirmando a presença dessa classe de alcaloides (Steele *et al.*, 2002).

O isolado também foi submetido a análise CLAE-DAD e apresentou apenas um pico com tempo de retenção (TR) de 9,21 min e absorbância na região do UV em λ 240,7 e 294,9nm (Figura 11). Brandão (2012) e Silva (2016) encontraram a mesma absorbância para uma porção isolada de *G. vellosii* associando a mesma a presença de alcaloide indólico ou que possuam um cromóforo semelhante. A presença das bandas λ 243, 289 e 396nm foram associados ao alcaloide indólico geissoschizolina (Aigotti *et al.*, 2022), sendo então, essa absorbância, sugestiva que o composto possa derivar desse alcaloide.

Dessa forma, foi possível obter um extrato e um rica em alcaloides indólicos, os quais apresentam características estruturais provavelmente associadas a derivados da geissoschizolina ou da geissospermina. Além disso, identificou-se a presença de alcaloides β -carbonílicos, sugerindo a possível ocorrência de flavopereirina ou de um derivado dessa substância. E um isolado, provavelmente, a geissoschizolina ou um derivado desta.

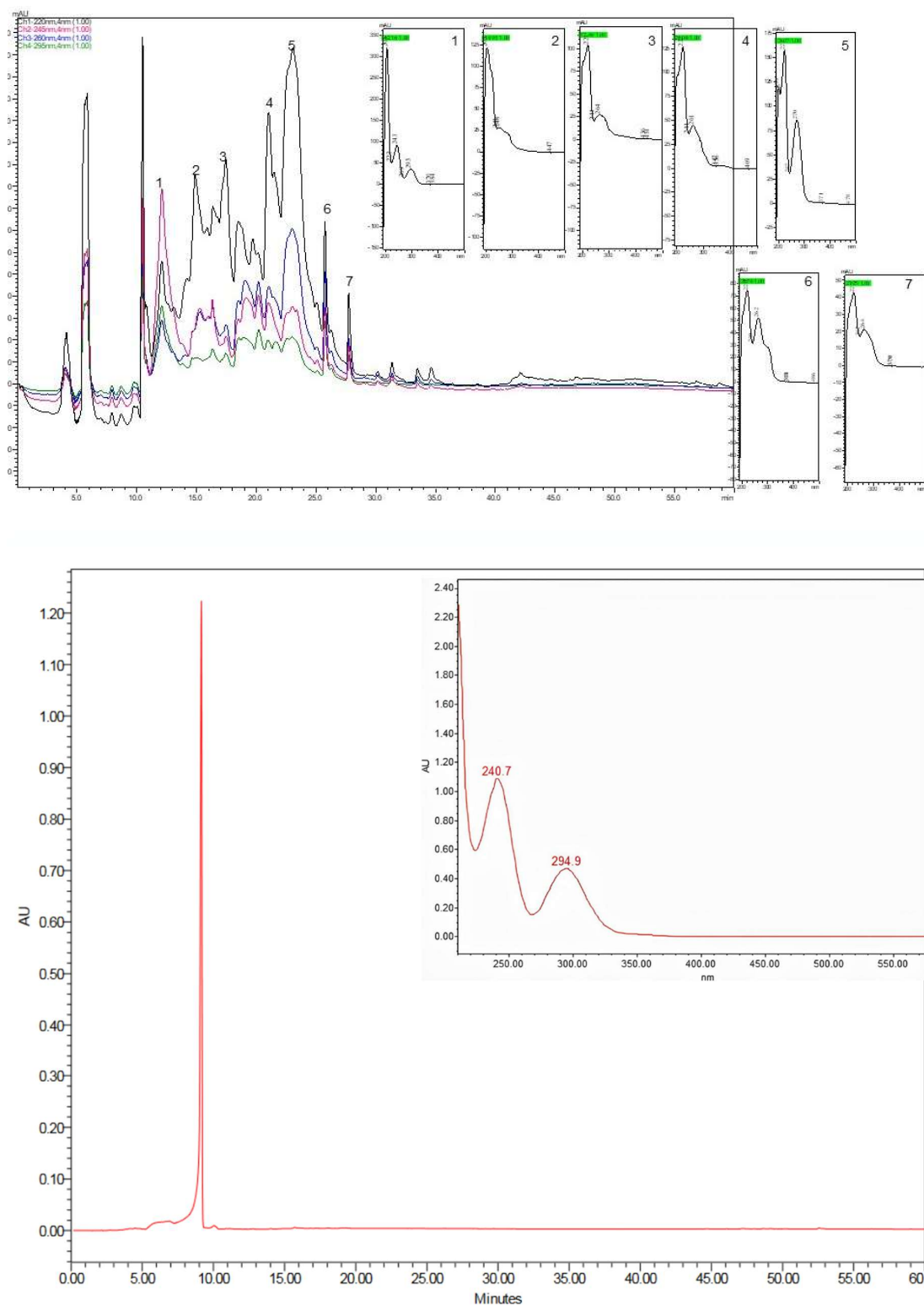


Figura 10 - Cromatogramas da FAGL e do isolado das cascas de *Geissospermum laeve*.

O isolado foi submetido a análise de LC-MS, foi possível perceber o íon molecular do cloro nas fragmentações m/z 347, que corresponde ao isótopo Cl-35

([M+Cl35]⁺), e abundância relativa (AR) de 100 sugere que este é o pico base, o que é consistente com a maior abundância natural de Cl-35 (cerca de 75%). Já a fragmentação m/z 349 corresponde ao isótopo Cl-37 ([M+Cl37]⁺), tendo abundância relativa (AR) de 30 é consistente com a menor abundância natural de Cl-37 (cerca de 24%; Figura 11). A relação de abundância entre Cl-35 e Cl-37 é aproximadamente 3:1, o que se reflete na relação de intensidade dos picos observados (100:30).

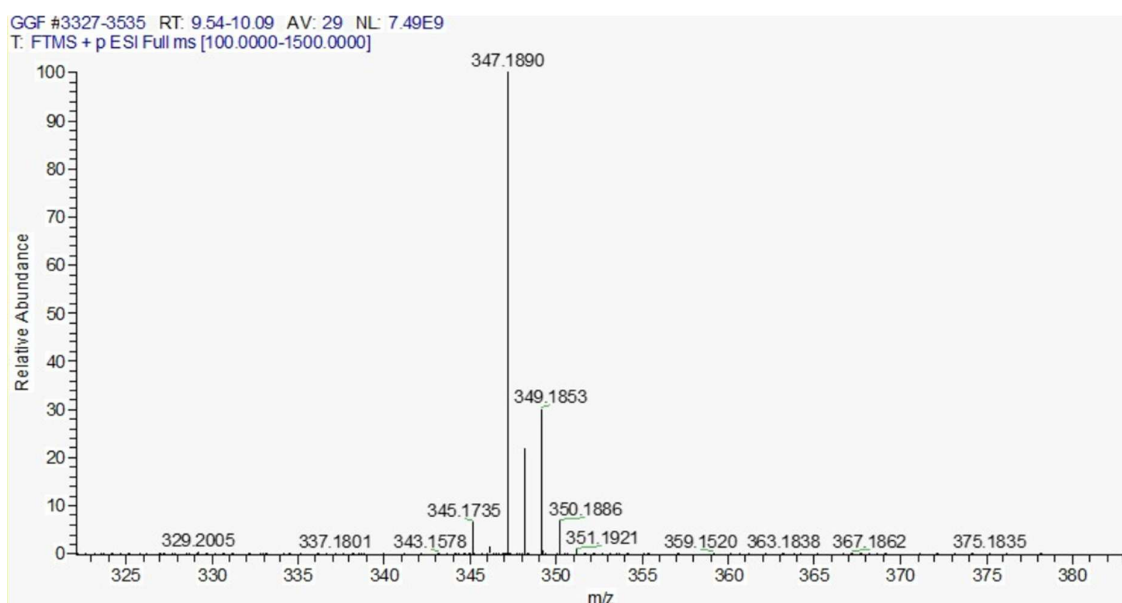


Figura 11 – Espectro de massas de íon totais no modo positivo de ionização do isolado obtido das cascas de *G. laeve*.

Para tentar elucidar a composto isolado, as análise de FT-IR demonstraram o caráter indólico, onde é possível observar as deformações axiais C-H (3281, 3208 cm^{-1}) e de ligações C=C (1603 e 1486 cm^{-1}). A presença de grupo metila é sugerida pela absorção em 1463 cm^{-1} , atribuída à deformação angular, assim como bandas entre 1350 e 1150 cm^{-1} , que sugerem ligações de C-H em hidrocarbonetos e a absorção em 780 cm^{-1} associados a hidrogênios vicinais em anel benzênico *orto*-dissubstituído (Figura 12).

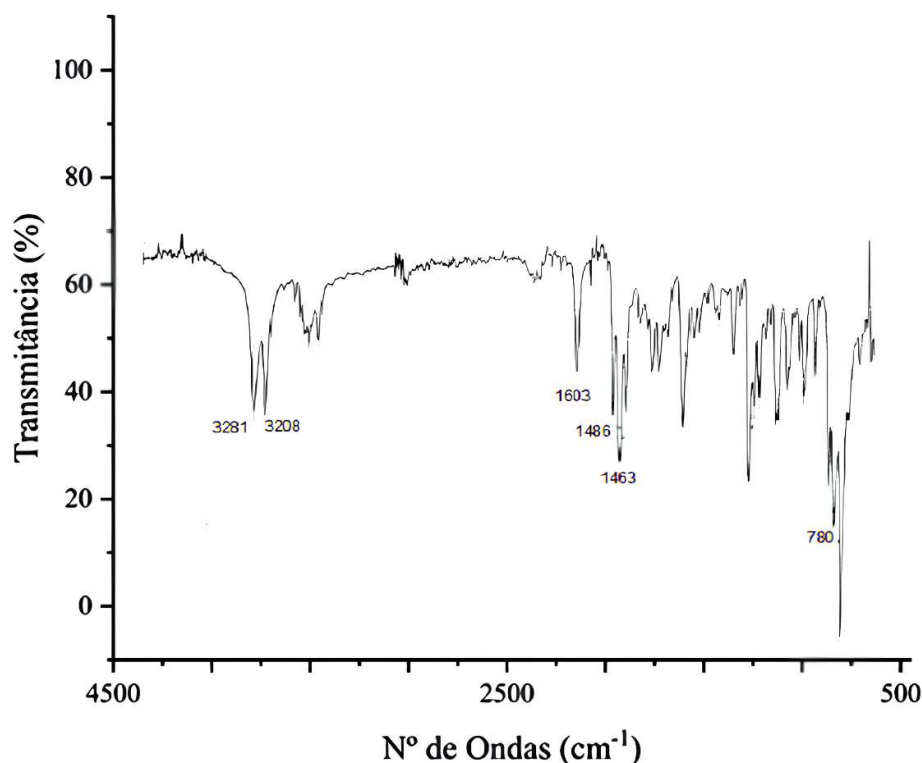


Figura 12 – Espectro de infravermelho obtido do composto isolado das cascas de *G. laeve*.

Assim, para confirmar a identidade do composto isolado, foi submetido a análise por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C onde podemos notar a presença de 20 carbonos com deslocamentos químicos em $\delta = 11,1; 22,8; 23,0; 28,1; 34,2; 34,6; 38,2; 52,8; 53,9; 63,6; 64,1; 65,1; 66,6; 76,4; 110,8; 120,4; 123,2; 129,8; 134,1$ e $150,5$ ppm e os sinais integrados de hidrogênio em $\delta = 7.33$ (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.09 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.81 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.63 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 5.46 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.94 - 4.06 (m, 2H), 3.70 - 3.90 (m, 4H), 3.64 (dd, $J = 10.6, 6.7$ Hz, 1H), 3.45 (br t, $J = 13.9$ Hz, 1H), 2.49 - 2.73 (m, 2H), 2.42 (br dd, $J = 14.9, 2.4$ Hz, 1H), 2.14 - 2.24 (m, 1H), 1.98 (br dd, $J = 13.0, 6.3$ Hz, 1H), 1.76 - 1.92 (m, 1H), 1.74 (br s, 1H), 1.29 - 1.54 (m, 2H), 1.03 ppm (t, $J = 7.4$ Hz, 3H; Figura 13).

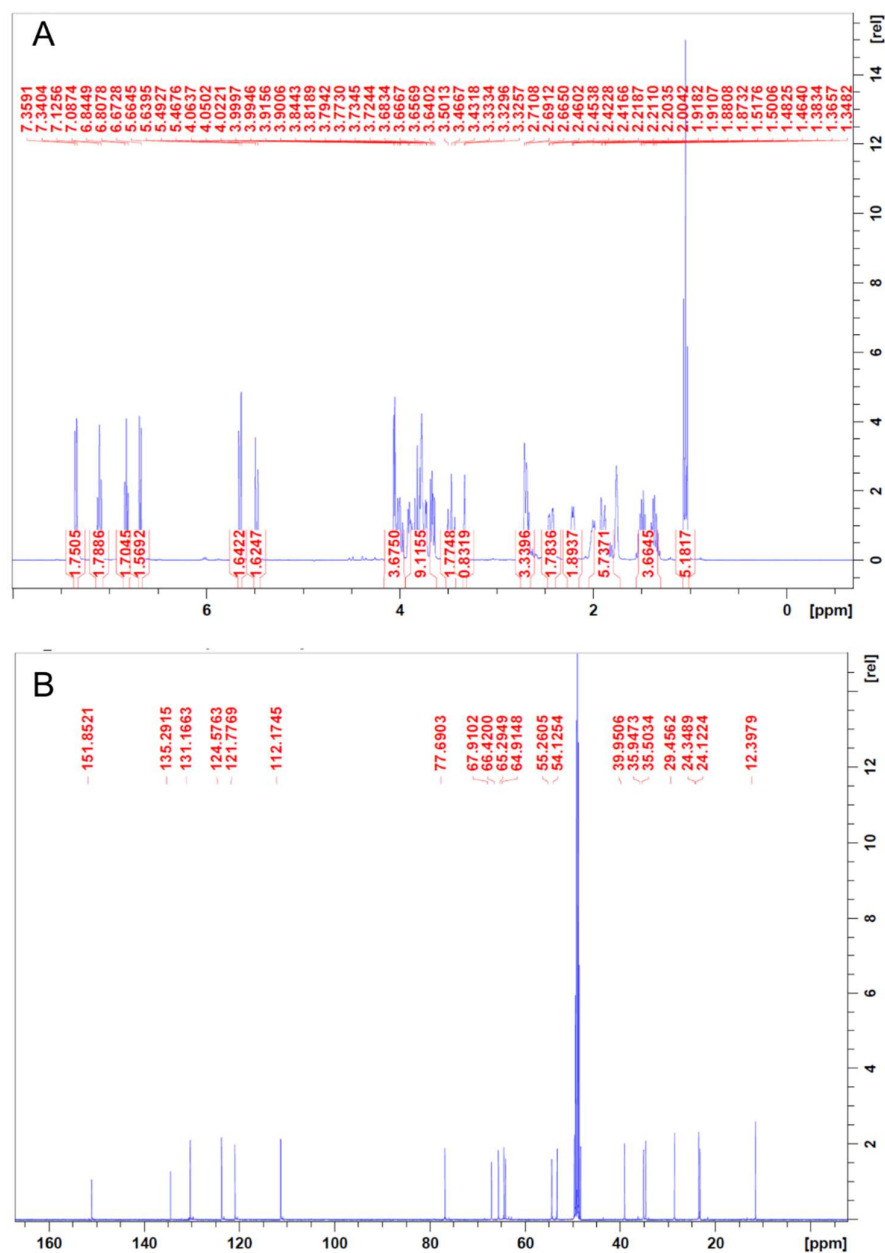


Figura 13 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do isolado obtido por partição.
 Legenda: A = RMN ^1H (400 hz); B = RMN ^{13}C (100 hz).

No espectro podemos notar a ressonância característica do sistema indólico $\delta_{\text{H}} = 7,33$ (d, 7,46, 1H, H-9), $\delta_{\text{H}} = 6,81$ (t, 7,5, 1H, H-10), $\delta_{\text{H}} = 7,09$ (t, 7,7, 1H, H-11) e $\delta_{\text{H}} = 6,66$ (d, 7,8, 1H, H-12). Podemos observar a presença de um grupo C-17 CH_2OH ($\delta_{\text{H}} = 3,64$ e $3,79$; $\delta_{\text{C}} = 65,1$) e um grupamento C-19 e C-18 etila ($\delta_{\text{H}} 1,02$ (CH_3), $1,33$ (CH_2a) e $1,41$ (CH_2b); $\delta_{\text{C}} = 11,1$ e $22,8$). Ainda, é possível encontrar a ressonância de um grupo metila $\delta_{\text{H}} = 1,03$ (t, $J = 7,4$), e $1,33$ (m) e $1,41$ (m) (Silva, 2016; Bastos *et al.*, 2023). Os sinais encontrados nesse estudo para ^1H e ^{13}C são similares ao

encontrados por Bastos e colaboradores (2023, Tabela 01), com alteração de algumas multiplicidades de sinais para ^1H e a ausência de integral de dois sinais δ_{H} 3,85 (dd, 12,0, 6,8) e 3,96 (ddd, 12,0, 11,8; 8,1).

Tabela 01 - Comparação entre os sinais de RMN de H^1 e C^{13} obtidos e com os encontrados na literatura

Posição	δ_{H}	δ_{H}^*	δ_{C}	δ_{C}^*
1				
2	4,01 (m)	4,03 (d, 5,5)	63,6	64,3
3	3,79 (m)	3,72 (dd, 14,5, 4,2)	76,4	77,0
4				
5		3,85 (dd, 12,0, 6,8) 3,96 (ddd, 12,0, 11,8; 8,1)	64,1	64,2
6	2,66 (m)	2,66 (m)	34,6	35,1
7			52,8	53,4
8			134,1	134,2
9	7,33 (d, 7,46)	7,29 (d, 7,5)	123,2	123,7
10	6,81 (t, 7,15)	6,80 (t, 7,5)	120,4	121,0
11	7,09 (t, 7,7)	7,08 (t, 7,5)	129,8	130,4
12	6,66 (d, 7,8)	6,65 (d, 7,7)	110,8	111,4
13			150,5	151,0
14	2,42 (br dd, 14,92; 2,45) 1,87 (m)	2,43 (dd, 15,0, 2,6) 1,87 (dt, 15,0; 3,1)	23,0	23,3
15	1,74 (br)	1,74 (br)	28,1	28,7
16	2,19 (m)	2,16 (m)	34,2	34,8
17	3,64 (dd, 10,5; 6,6) 3,79 (m)	3,64 (dd, 10,5; 6,8) 3,79 (dd, 10,5, 9,7)	65,1	65,6
18	1,03 (t, 7,4)	1,02 (t, 7,4)	11,1	11,5
19	1,33 (m) 1,41 (m)	1,33 (m) 1,46 (m)	22,8	23,6
20	1,98 (br dd, 13,02, 6,30)	1,96 (m)	38,2	39,2
21	3,45 (t, 13,9)	3,42 (t, 14,0) 3,71 (m)	53,9	54,2
22	5,46 (d, 10,0) 5,63 (d, 10,0)	5,40 (d, 10,0) 5,59 (d, 10,0)	66,6	67,1

Legenda: * Sinais encontrados por Bastos *et al.*, 2023.

Dessa forma, as análises químicas permitem inferir que o isolado trata-se da geissoschizolina (N4) metil cloro (GN4MC; Figura 14), um alcaloide de caráter indólico. No processo de extração e isolamento do alcaloide foi utilizado o ácido clorídrico (HCl) que pode protonar grupos funcionais específicos no alcaloide bisindólico, como aminas, amidas ou ésteres, tornando as ligações mais suscetíveis à clivagem. Nos alcaloides indolmonoterpenos têm ligação amida que pode ser susceptível a hidrólise ocorrendo adição nucleofílica de água ao carbono carbonílico, levando à ruptura da ligação C-N e à formação de ácidos carboxílicos e aminas. Agora, se houver um éter ou uma ligação instável entre os anéis, a protonação pode facilitar a clivagem dessas ligações, resultando em fragmentos menores e acredita-se que isso tenha ocorrido no presente estudo (Lounasmaa; Nemes, 1982).

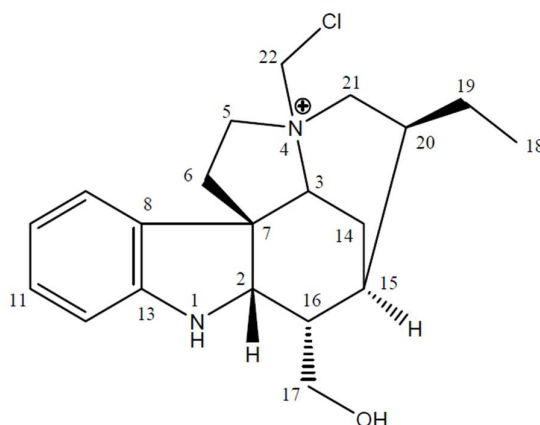


Figura 14 – Estrutura da Geissoschizolina (N4) metil cloro.

Alcaloides indólicos, os bisindólicos e os β -carbonílicos, formam os principais grupos de metabólitos isolados de *G. laeve* e os β -carbonílicos são os principais compostos com atividade farmacológica da espécie. Além disso, entre os alcaloides isolados de *G. laeve* os indólicos são os mais numerosos, com mais de 15 sendo isolados da espécie (Marion, 1952; Rapoport *et al.* 1958; Hughes; Rapoport, 1958; Wenkert; Kilzer, 1962; Rapoport *et al.*, 1958; Rapoport; Moore, 1962; Moore; Rapoport, 1973; Werner *et al.*, 2009; Ishiyama; Matsumoto; Sekiguchi, 2005; Dias, 2012; Ramos *et al.*, 2017).

Conforme dito anteriormente, a presença do HCl pode ter contribuído para a quebra de um alcaloide bisindólico com formação de um alcaloide indólico clorado, o

que pode trazer diversas vantagens em termos farmacológicos. O alcaloide bisindolico possui uma massa molecular (MM) maior, o que pode ser um fator limitante na absorção no trato gastrointestinal e distribuição. A fragmentação e adição de Cl⁻, pode levar a redução da MM e aumento da lipofilicidade do composto, facilitando sua absorção pelas membranas biológicas e distribuição para o sistema nervoso central (SNC). Compostos clorados podem apresentar propriedades antimicrobianas, teoricamente podem ter ação contra patógenos resistentes (Ferreira; Nascimento; Dolabela, 2020).

Diante da premissa que a adição de cloro pode ser um fator favorável para atividade contra bactérias resistentes, optou-se por trabalhar com este alcaloide. Como a *G. laeve* possui alcaloides indolicos, bisindolicos e β -carbolinico, optou-se pela inclusão do EEGlc e FAGL. Ressalta-se que estudos anteriores relacionam a atividade antiparasitária ao alcaloide β -carolinico (Steele *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2019).

5.2 Atividades Biológicas

Após o semeio em em ágar cromogênio, observou-se colônias muito bem caracterizadas, de contornos definidos, sem o crescimento de colônias com coloração distintas (Figura 15). *CHROMagar*TM Orientation é um meio de cultura não-seletivo desenvolvido para atestar a pureza de amostras biológicas através de determinantes cromogênicos incluídos no meio (Manickam *et al.*, 2013). As bactérias necessitam de um grupo específico de componentes para o seu desenvolvimento, ao adicionar um fator cromogênico a uma ou mais componentes, as colônias crescem com características distintas a cada microrganismo permitindo sua distinção dentro do meio, assim, se mais de um microrganismo estiver presente na amostra é possível diferenciá-los (Merlino *et al.*, 1996; Manickam *et al.*, 2013, Ali *et al.*, 2023).

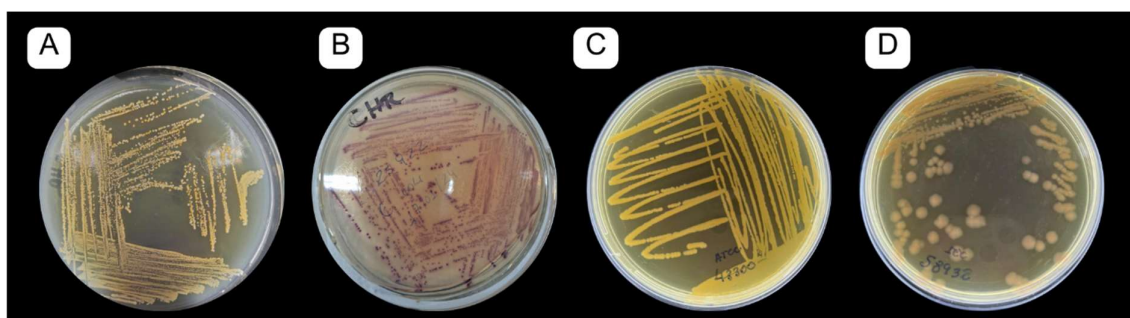


Figura 15 – Cepas semeadas no CHROMagar™ *Orientation*, apresentando colônias confluentes e puras, sem crescimento de colônias distintas.

Legenda: A: ATCC 6538 (*S. aureus*), B: ATCC 25922 (*E. coli*), C: ATCC 43300 (MRSA), e IEC/BAC 58932 (*E. coli* coprodutora de NDM-KPC).

A atividade antimicrobiana demonstrou que a fração de alcaloides foi mais ativa que o extrato para as cepas de *S. aureus*, onde obtemos o CIM de 50 µg/mL e 100 µg/mL para as cepas ATCC 6538 (sensível) e ATCC 43300 (resistente), respectivamente (Tabela 2; Figura 16 e 17). A análise de CLAE-DAD demonstrou que a fração possui alcaloides indólicos e β-carbonílicos, como não houve limitação da ação frente as duas cepas de *S. aureus*, os alcaloides presença, seja em sinergismo ou isoladamente, devem atuar na parede celular de bactérias Gram-positivas.

Tabela 02 – Atividade anti-estafilocócica do extrato e da fração de *G. laeve*

Microrganismo/ Amostra teste	CIM µg/mL			
	ATCC 6538	ATCC 43300	ATCC 25922	IEC-BAC 58932
Extrato	200	200	>200	>200
Fração	50	100	>200	>200
GN4MC	>200	>200	>200	>200
Benzilpenicilina	0,0625	32	-	-
Imipenem	-	-	0,125	32

Legenda: GN4MC: geissoschizolina (N4) metil cloro. ATCC 6538 (*S. aureus*), ATCC 25922 (*E. coli*), ATCC 43300 (MRSA), e IEC/BAC 58932 (*E. coli* coprodutora de NDM-KPC).

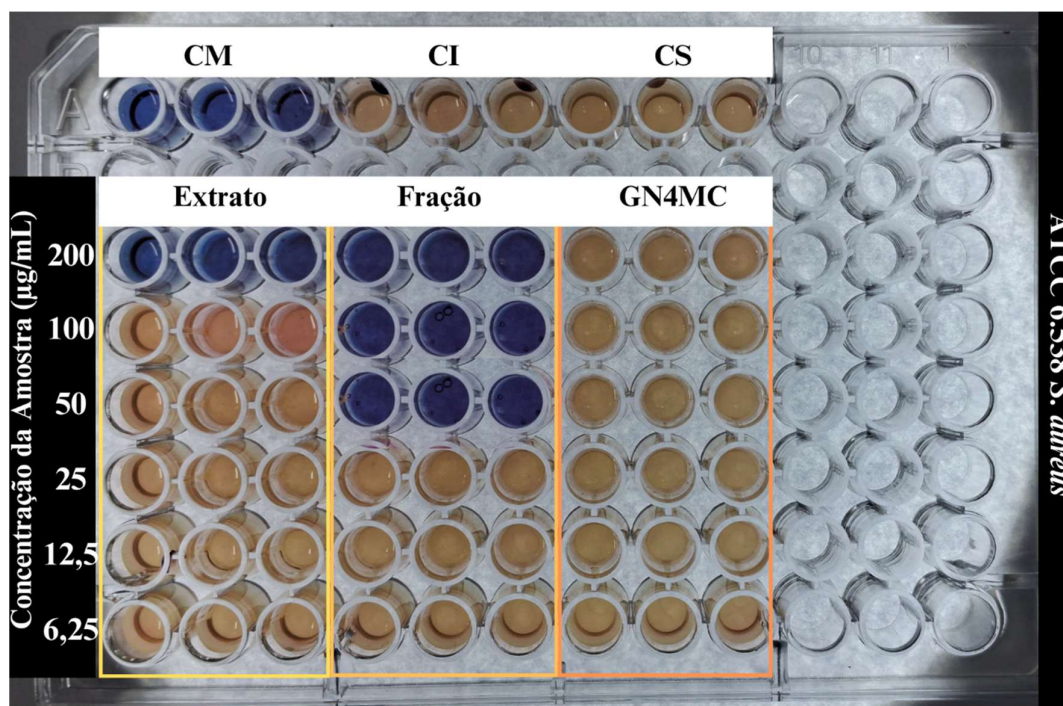


Figura 16 – Inibição do crescimento em *S. aureus* (ATCC 6538) sem resistência, do extrato, fração de alcaloides e isolados das cascas de *G. laeve*.

Legenda: CM: controle do meio; CI: crescimento do inoculo; CS: controle do solvente.

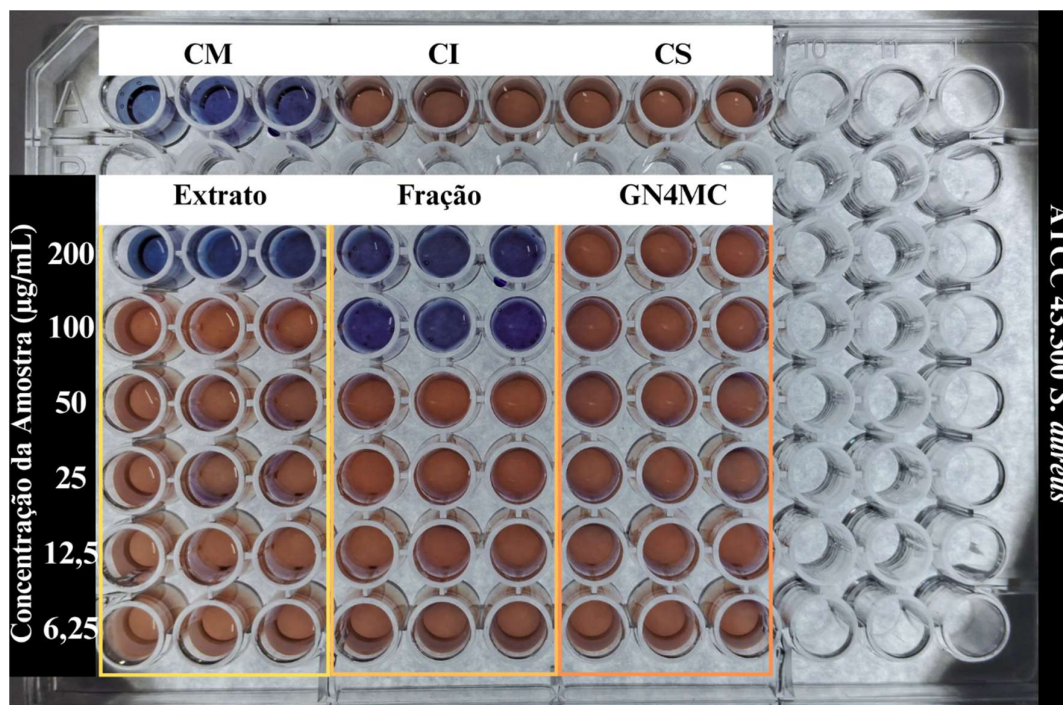


Figura 17 – Inibição do crescimento em MRSA (ATCC 43300), do extrato, fração de alcaloides e isolados das cascas de *G. laeve*.

Legenda: CM: controle do meio; CI: crescimento do inoculo; CS: controle do solvente.

O EEGLC, FAGL e alcaloide, para as cepas de *E. coli*, não inibiram o crescimento bacteriano nas concentrações testadas (Tabela 2; Figuras 18 e 19). A diferença de resultados entre o *S. aureus* e *E. coli* pode estar relacionado a diferenças em suas paredes. No *S. aureus* não há uma membrana externa, a sua parede de peptidoglicano espessa não impede a entrada de compostos hidrofílicos e a presença de ácidos teicóicos e lipoteicóicos, geralmente, não cria uma barreira significativa (Colclough *et al.*, 2020). Estas características acabam facilitando a permeabilidade das moléculas, facilitando sua chegada em concentrações adequadas no sítio de ação (Singh *et al.*, 2022). Por outro lado, a *E. coli* possui uma membrana externa que atua como uma barreira seletiva, reduzindo a permeabilidade de moléculas hidrofílicas (Colclough *et al.*, 2020). A permeabilidade através da parede se deve a porina que limita a passagem de moléculas maiores, ainda há uma camada de lipopolissacarídeos que dificulta a difusão de moléculas hidrofóbicas, tornando a bactéria mais resistente a alguns antibióticos (Colclough *et al.*, 2020).

Em termos farmacológicos, é muito importante que a molécula consiga chegar ao seu sítio de ação, permaneça no local por tempo suficiente para que o efeito ocorra. Desta forma, diferenças de permeabilidade entre as bactérias Gram positivas e negativas podem explicar a atividade em Gram positiva somente.

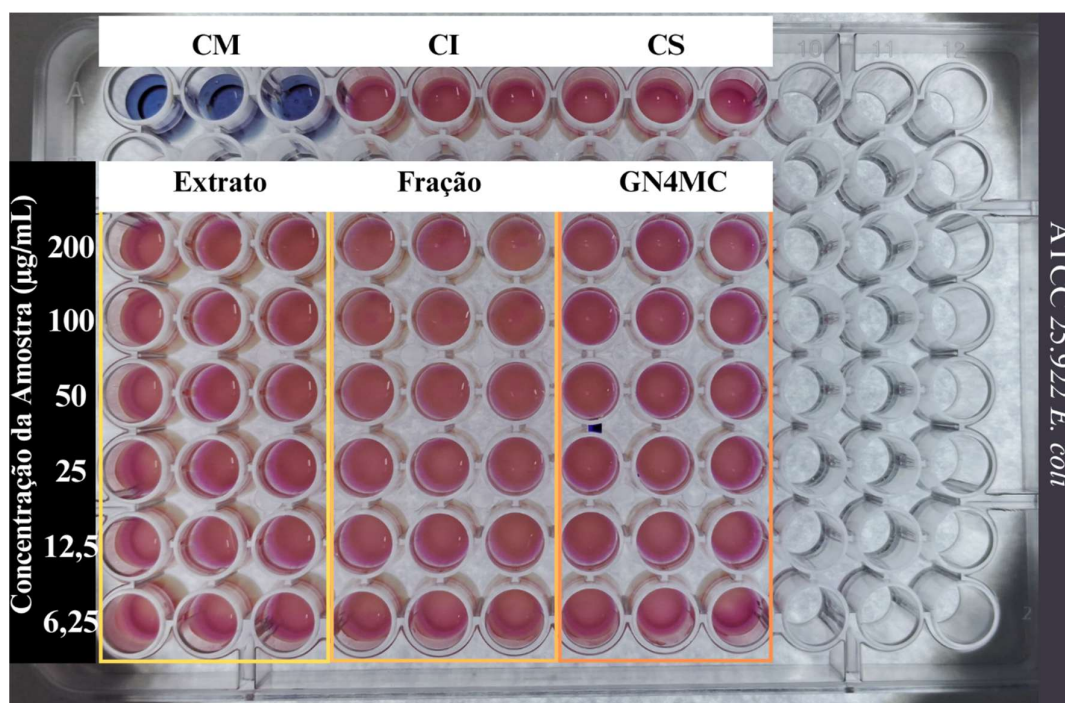


Figura 18 – Ausência de inibição do do crescimento em *E. coli* (ATCC 25922) sem resistência, do

extrato, fração de alcaloides e isolados das cascas de *G. laeve*.
 Legenda: CM: controle do meio; CI: crescimento do inoculo; CS: controle do solvente.

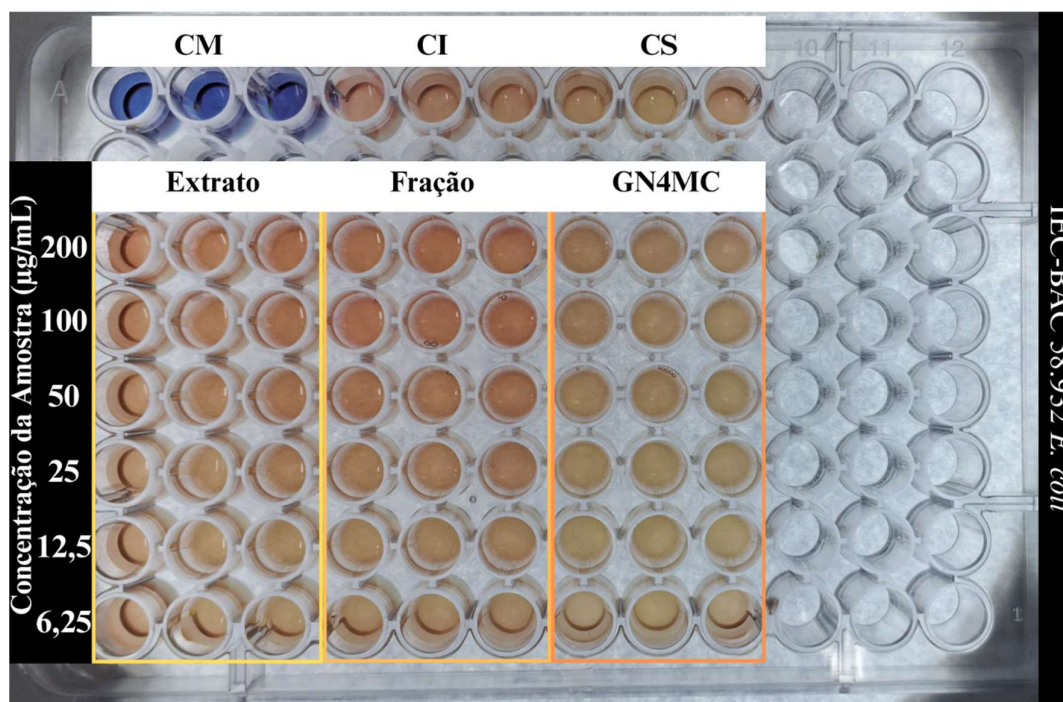


Figura 19 – Ausência de inibição do crescimento em *E. coli* (IEC-BAC 58932) coprodutora de NDM-KPC, do extrato, fração de alcaloides e isolados das cascas de *G. laeve*.

Legenda: CM: controle do meio; CI: crescimento do inoculo; CS: controle do solvente.

Conforme descrito anteriormente, a atividade antimicrobiana de *G. laeve* foi descrita em estudos pregressos, sendo utilizados os métodos de difusão em Agar (Correia *et al.*, 2008; Brandão, 2012) e microdilução (Brandão, 2012; Dias, 2012; Saraiva *et al.*, 2012). Estes resultados corroboram com os resultados do presente estudo.

Avaliou-se no presente estudo, se a associação do EEGL, FAGL e da GN4MC com a benzilpenicilina produz um efeito sinérgico em MRSA. Especificamente para o EEGL observou-se que, de forma proporcional, à medida que se aumenta a concentração EEGL (12,5 a 200 µg/mL) a concentração do antibiótico cai pela metade. Concentrações do EEGL abaixo de 12,5 mg/mL não é necessário mudar a concentração do antibiótico (Figura 20). Estes resultados sugerem que a resposta inibitória foi concentração-dependente no intervalo de 200 a 12,5 mg/mL, porém abaixo desta concentração não se observou esta correlação. Esta associação levou a um efeito sinérgico de potenciação (Tabela 3).

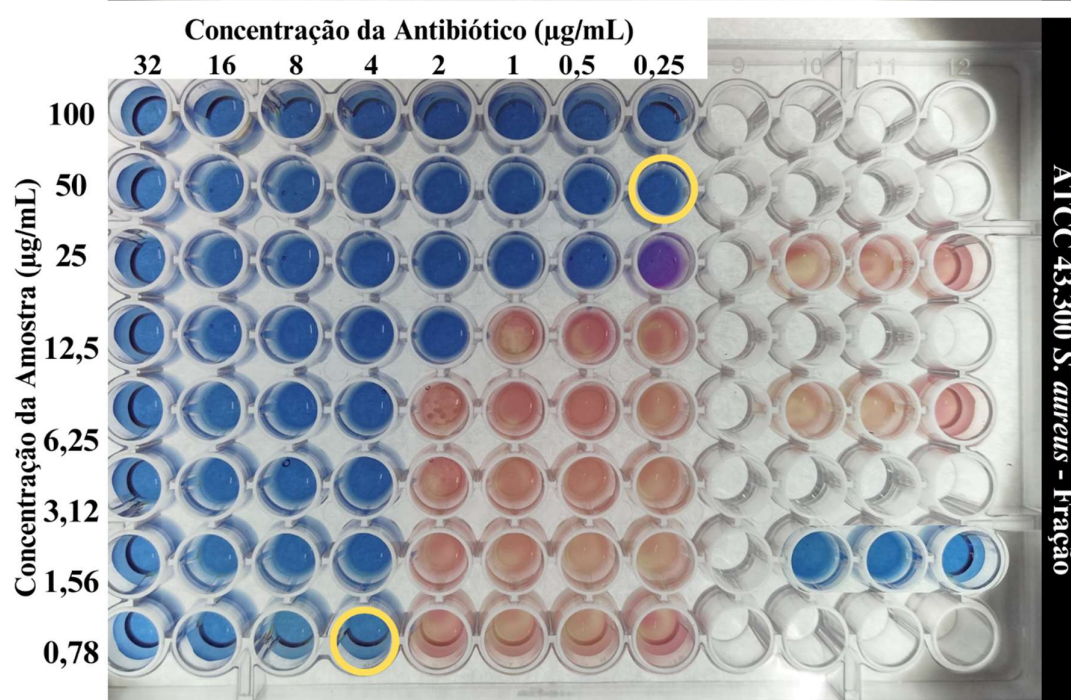
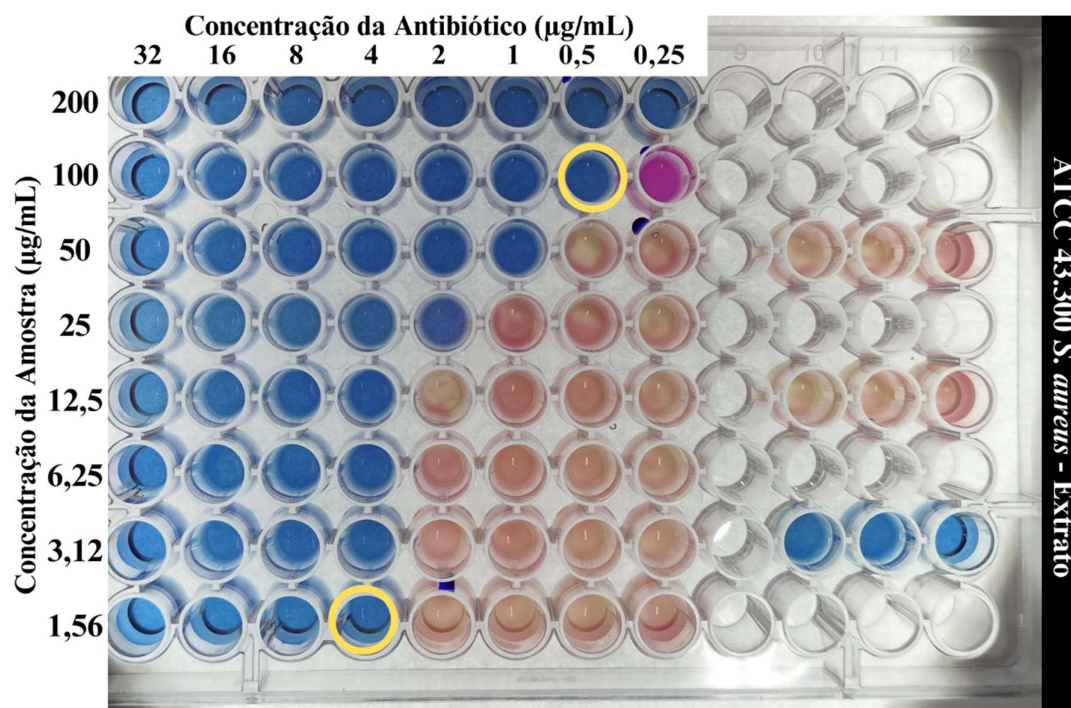
Para a FAGL não foi observado o mesmo padrão de reposta, de 12,5 µg/mL para 25 µg/mL é necessário aumentar o quadruplo da concentração do antibiótico, enquanto que de 25 µg/mL para 50 µg/mL, é apenas necessário o dobro, padrão que se repete para de 50 a 100 µg/mL, mantendo-se um platô após isso nas concentrações testadas. Concentrações do EEGl abaixo de 6,25 µg/mL não é necessário mudar a concentração do antibiótico (Figura 20). Estes resultados sugerem que a resposta inibitória foi concentração-dependente no intervalo de 25 a 50 µg/mL, porém abaixo desta concentração não se observou esta correlação. Esta associação levou a um efeito sinérgico de potenciação (Tabela 3).

Para todas as concentrações testadas de GN4MC não houve alteração dos resultados, demonstrando que esse alcaloide não apresenta uma resposta concentração-dependente e que, independente a concentração, a resposta será a mesma. Dentre os resultados apresentados, a FAGL apresenta o melhor perfil sinérgico, visto que, apenas 50 µg é capaz de reduzir a concentração da benzilpenicilina em 64 vezes.

Tabela 03 – Efeito sinérgico do extrato, fração e isolado das cascas de *G. laeve* utilizando os antimicrobianos benzilpenicilina e Imipenem, através do índice de concentração inibitória fracionada (IFIC)

	<i>S. aureus</i> 43300	Efeito sinérgico	<i>E. coli</i> 58932	Efeito sinérgico
Extrato	0,02	Potenciação	2,00	Indiferente
Fração	0,01	Potenciação	0,25	Potenciação
Isolado	0,12	Potenciação	2,00	Indiferente

Legenda: ≤ 0,5: sinergismo de potenciação; 0,5 < CIF ≤ 1: sinergismo de adição; 1 < CIF ≤ 2: indiferente; e >2: antagonista.



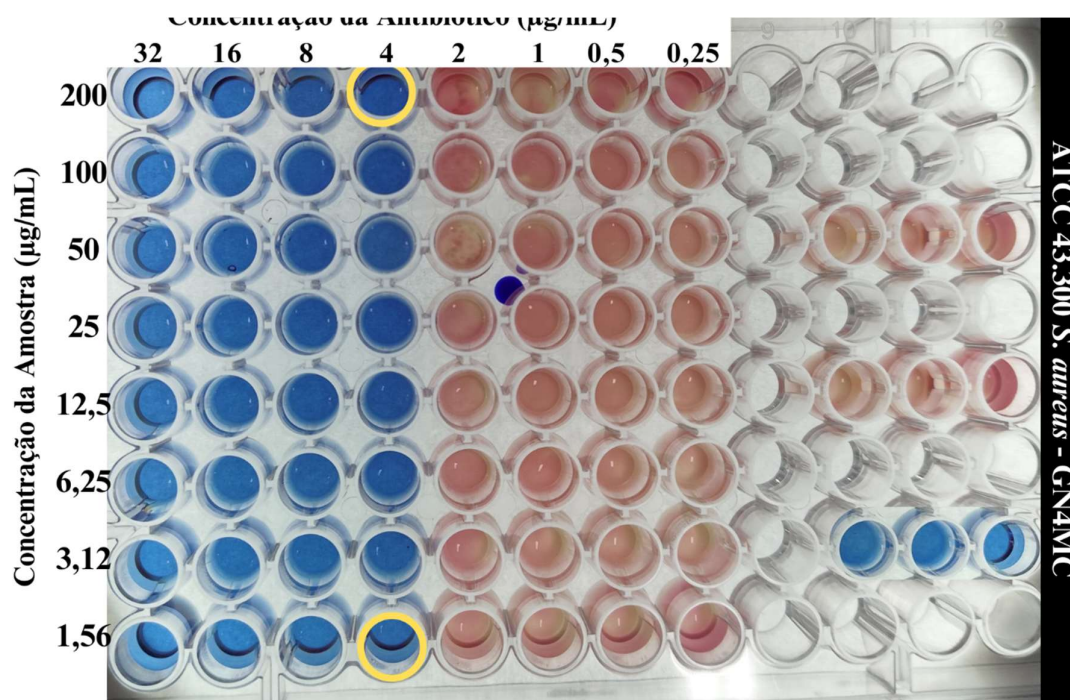


Figura 20 – Efeito sinérgico entre o EEGL, FAGL e a GN4MC com a benzilpenicilina frente a ATCC 43300 de MRSA.

Legenda: A: Menor concentração que obteve resultado com sinergismo de potenciação com a concentração do extrato em 1,56 µg e da benzilpenicilina de 0,5 µg. B: Menor concentração que obteve resultado com sinergismo de potenciação com a concentração da fração em 0,78 µg e do antibiótico de 0,25 µg C: Menor concentração que obteve resultado com sinergismo de potenciação com a concentração do isolado em 1,56 µg e do antibiótico de 4 µg.

Para avaliação do efeito sinérgico frente a *E. coli* (IEC-BAC 58932), coprodutora de NMD e KPC, utilizou-se diferentes concentrações das amostras testes associados a diferentes concentrações de Imipenem, que isoladamente apresentou CIM de 32 µg/mL. O EEGLc, nas concentrações avaliadas, não interferiu no CIM do imipenem em *E. coli*. Resultado similar foi observado para a GN4MC, isto é, em nenhuma concentração usada houve redução do CIM do Imipenem em *E. coli*. Entretanto, para a FAGL observou-se redução do CIM quando associado a concentração de 200 µg/mL. Quando se associou 100 µg/mL da FAGL, houve uma redução de 50% na concentração do antibiótico para inibir o crescimento bacteriano (Figura 21).

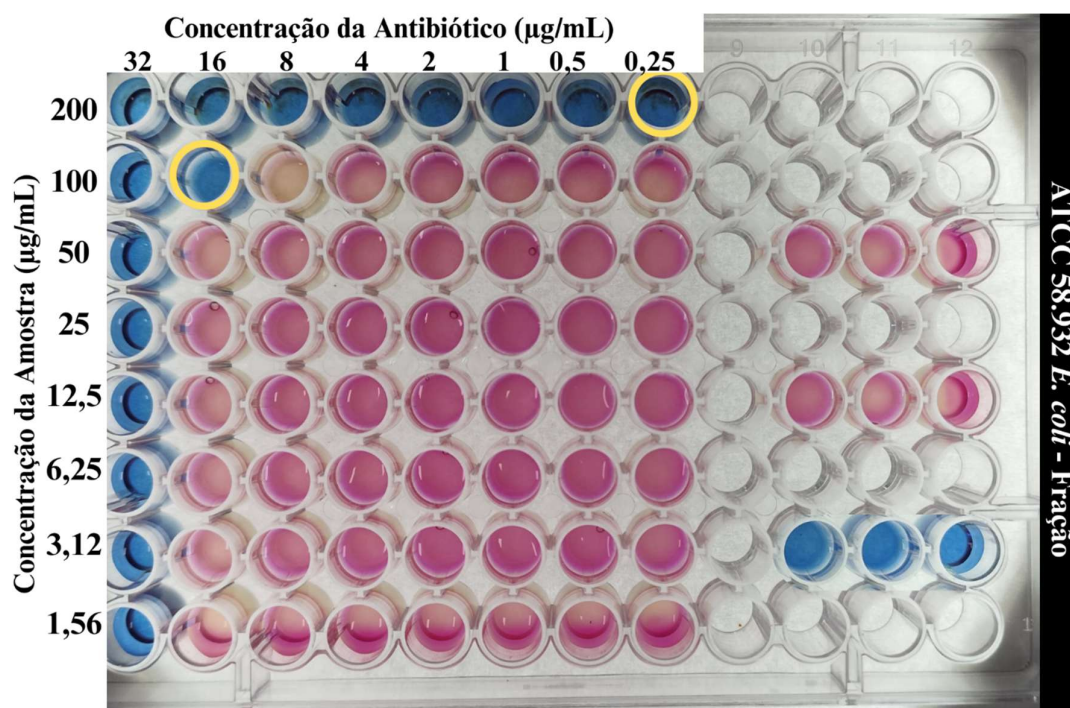
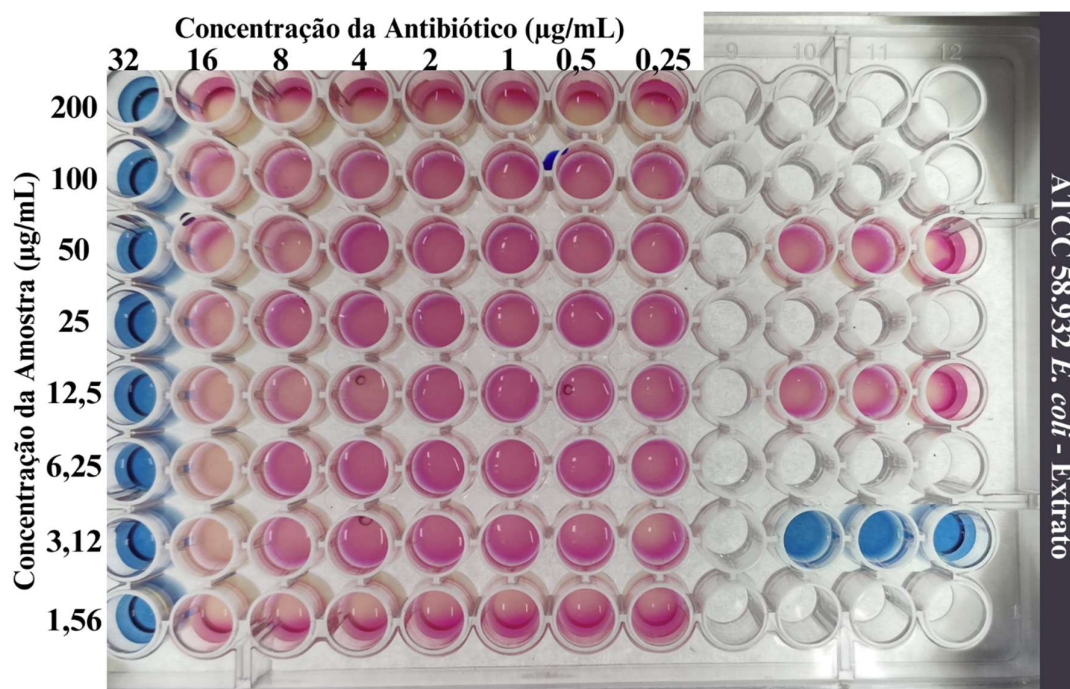
De forma similar ao *S. aureus*, os receptores envolvidos na atividade de β -lactâmicos como o Imipenem (PBP) encontram-se na membrana celular. Diferente da *S. aureus*, a parede bacteriana da *E. coli* e localização das β -lactamases podem dificultar a ação dos β -lactâmicos. Inicialmente, o Imipenem deve atravessar a membrana externa que é constituída por uma bicamada lipídica contendo

lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas transmembrana (porinas). Entre a parede e a membrana existe o espaço periplasmático onde pode ser armazenada as β -lactamases (Beacham, 1979; Davies; Everett, 2021).

No caso do Imipenem, uma molécula pequena (300 Da) e hidrofílica, atravessa a membrana externa, porém necessita do transporte facilitado por porinas OmpC e OmpF (Masi *et al.*, 2022). Entretanto, algumas cepas de *E. coli* resistentes podem reduzir a expressão ou modificar a estrutura de OmpC e OmpF, dificultando a entrada do imipenem (Masi *et al.*, 2022; Davin-Regli; Pagès; Vergalli, 2024). Algumas cepas de *E. coli* produzem carbapenemase (KPC, NDM, OXA-48) que podem degradar o Imipenem antes que atinjam seu alvo (Davin-Regli; Pagès; Vergalli, 2024). No presente estudo utilizou-se uma *E. coli* que produz simultaneamente duas carbapenemases tornando a bactéria altamente resistente e a reversão da resistência pela FAGL sugere inibição das carbapenemases de forma direta, ou inibição de genes envolvidos na sua síntese.

O alcaloide berberina suprimiu a transcrição dos genes que codificam β -lactamases; aumenta a permeabilidade da membrana bacteriana, facilitando a entrada de β -lactâmicos; interfere no *quorum sensing*, reduzindo a resistência bacteriana global; potencializa carbapenêmicos e cefalosporinas contra bactérias produtoras de β -lactamase (Zhao *et al.*, 2024). Desta forma, o mecanismo envolvido no sinergismo produzido pela FAGL em *E. coli* precisa ser investigado.

Saraiva e colaboradores (2012) utilizando o teste de dico-difusão demonstrou que o extrato etanólico e a fração de alcaloides demonstraram efeito sinérgico frente a *S. aureus* resistente oxacilina (ORSA), não apresentando resultado para a cepa não resistente, utilizando os antimicrobianos ciprofloxacino, clindamicina e vancomicina. Estes fármacos atuam em diversos níveis do microrganismo, agindo sobre a síntese do DNA, inibição proteica, e síntese da parede celular, o que vislumbra a ação antimicrobiana de *G. laeve* é aumentada na presença dos antibióticos.



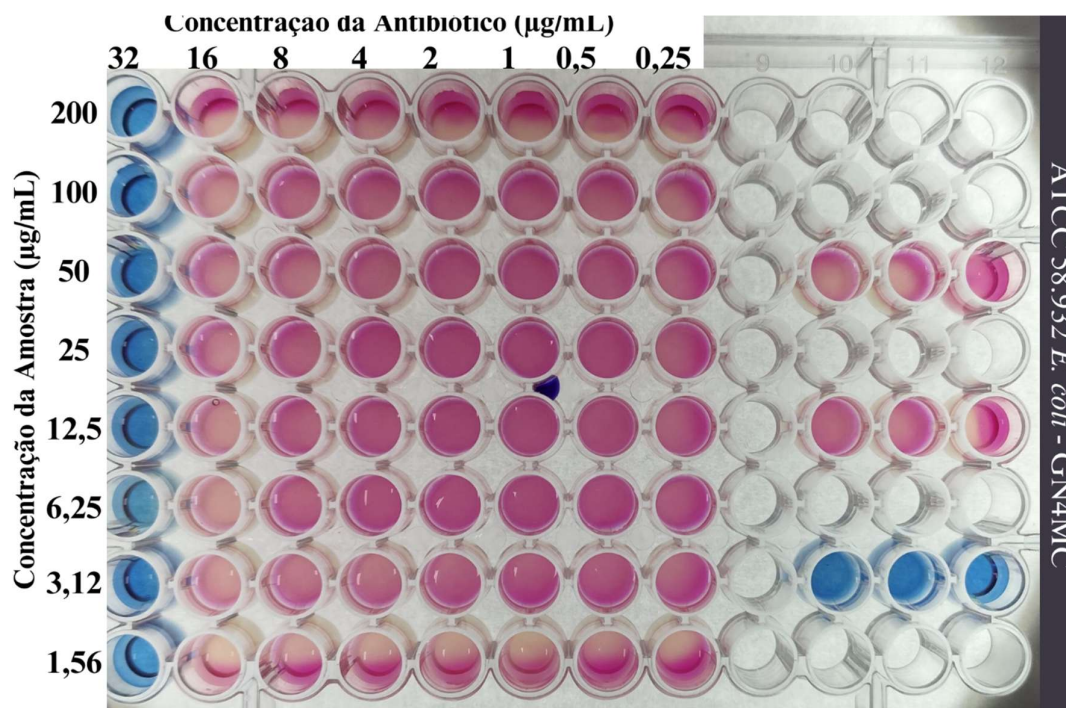


Figura 21 – Efeito sinérgico entre o EEGl, FAGL e a GN4MC com o Imipenem frente a ATCC 58932 de *E. coli* (coprodutota de NDM-KPC).

Legenda: A: Efeito sinérgico indiferente entre o EEGl e o imipenem; B: Menor concentração que obteve resultado com sinergismo de adição com a concentração da FAGL em 50 µg e do antibiótico de 0,25 µg; C: Efeito sinérgico indiferente entre a GN4MC e o imipenem.

Na avaliação do biofilme, foi possível identificar que as duas cepas não resistentes, a ATCC 25922 e ATCC 6538 foram fracas a moderadamente produtoras de biofilme, enquanto que as cepas ATCC 43300 e IEC 58932 foram identificadas como fortes produtoras de biofilme (Tabela 4). Existem diferenças pontuais na composição, estabilidade e como ocorre a interação entre os biofilmes formados por Gram-positivas e negativas com as comunidades bacteriana internas e o meio externo, contudo, eles servem como defesa a agentes sanitizantes, antimicrobianos e a resposta imune, além de aumentar a virulência dessas cepas (Flemming *et al.*, 2016).

Tabela 04 – Adesão das bactérias aos poços da placa de poliestireno para observação da produção de biofilme.

	Padrões	Absorbância	Adesão
	CP	0,121±0,002	Fortemente Aderente
	CN	0,011±0,001	Não Aderentes
Amostras			

ATCC 25922	0,075±0,006	Fraca a Moderadamente Aderentes
IEC 58932	0,069±0,001	Fortemente Aderente
ATCC 6835	0,105±0,009	Fraca a Moderadamente Aderentes
ATCC 43300	0,170±0,023	Fortemente Aderente

Legenda: CP: ATCC: 19606 (*Acinetobacter baumannii*); CN: ATCC DH5- α (*E. coli*); ATCC 6538 (*S. aureus*), ATCC 25922 (*E. coli*), ATCC 43300 (MRSA), e IEC/BAC 58932 (*E. coli* coprodutora de NDM-KPC). Classificação: não aderentes (quando a DO $\leq$ Doc; densidade óptica do controle negativo), fraca a moderadamente aderentes (DOc < DO $\leq$ 2×DOc) e fortemente aderente (2×DOc < DO).

A ação do EEGL e da FAGL nas cepas de *S. aureus* que foram produtoras de biofilme, pode demonstrar que os alcaloides presentes na planta podem agir para desestruturar ou inibir a formação do biofilme, sendo necessários estados adicionais. A berberina, um alcaloide isoquinolínico, demonstrou capacidade de inibir a formação do biofilme em *S. aureus* em uma resposta dose-dependente, levando a desagregação das colônias conforme a concentração aumentava, ela atua na inibição do sistema *Agr* e do aumento da produção de PIA (polissacarídeo intracelular de adesão), que contribuem para a persistência do biofilme. Estudos adicionais são necessários para explorar o potencial terapêutico da berberina no controle de infecções relacionadas a biofilmes (Chu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2022).

A reserpina, um alcaloide indólico, demonstrou atividade antibiofilme contra *S. aureus* em concentrações CIM/2. Em concentrações de 800 $\mu\text{g/mL}$, a reserpina inibiu a formação de biofilmes em até 43% e promoveu a erradicação de biofilmes pré-formados em mais de 70% na mesma concentração (Parai *et al.*, 2020). Por sua vez, a piperina, um alcaloide do grupo da piperidina, reduziu a formação de biofilmes de *S. aureus* em 28% e 40% nas concentrações de 8 $\mu\text{g/mL}$ e 16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Das *et al.*, 2024)

5.3 Estudos *in silico*

Dentro dos preceitos da Química Medicinal existem as teorias voltadas a descoberta de novos fármacos, que levam em conta as características desejáveis aos candidatos baseados em modelos relação estrutura/atividade (SAR) ou relação quantitativa estrutura/atividade (QSAR) que empregam coeficientes matemáticos para predizer atividades biológicas, propriedades físico-químicas, toxicológicas. Esse processo, prévio, dispensa a síntese e o uso de reagentes ou animais em estudo, o que gera uma receita positiva no custo milionário no desenvolvimento de novos

fármacos (Marques *et al.*, 2024).

Assim, os estudos *in silico* tem despontado como pré-requisitos para o desenvolvimento de novos fármacos ou análises de alterações moleculares feitas em fármacos já existentes. Dentre os modelos mais utilizados, encontra-se a Regra dos 5 (RO5), onde um bom candidato a fármaco oral deve apresentar peso molecular de até 500 (g/mol), número de ligações aceptores de hidrogênio ≤ 10 e de doadores de hidrogênio ≤ 5 e logaritmo de partição água/octano ($\log P$) ≤ 5 (Lipinski, 2004). Nesse estudo, propomos analisar o perfil, físico-químico, farmacocinético e toxicológico, além de avaliar a interação receptor-ligante por meio de ancoragem molecular e dinâmica molecular, foram escolhidas para esse estudo, com base nos estudos fitoquímicos, os alcaloides β -carbonílico Flavopeirerina (**1**), o bisindólico Geissospermina (**2**), e os indólicos Geissoschizina (**3**), Geissoschizolina (**4**), Geissoschizolina (N4) metil cloro (**5**) e Geissoschizolina (N4) óxido (**6**, Figura 22).

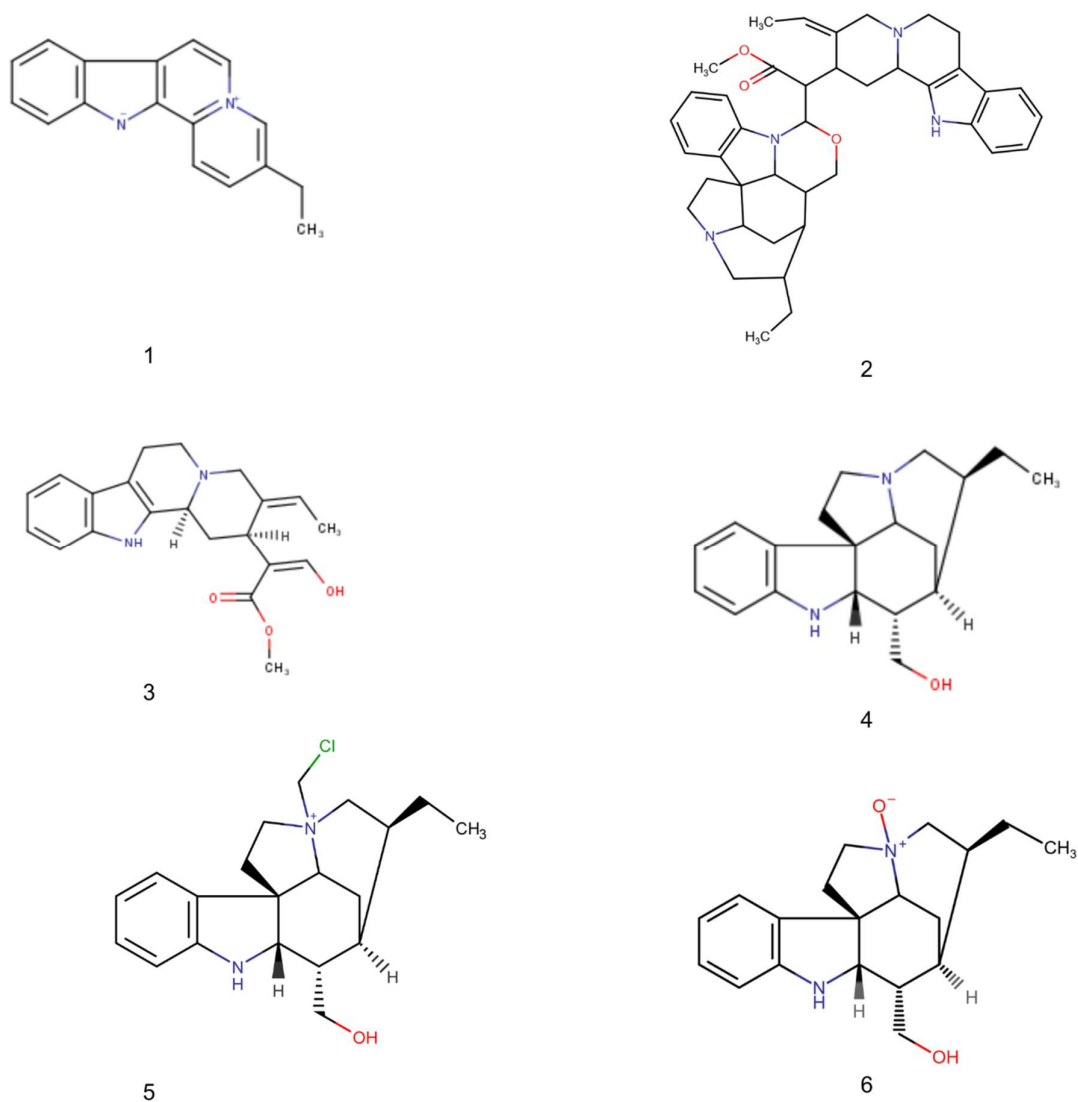


Figura 22 – Alcaloides selecionados para a avaliação *in silico* encontrados nas cascas de *G. laeve*.
 Legenda: Flavopeirerina (1), Geissospermina (2), Geissoschizina (3), Geissoschizolina (4), Geissoschizolina (N4) metil cloro (5) e Geissoschizolina (N4) óxido (6).

Todos os alcaloides selecionados foram submetidos a avaliação das propriedades físico-químicas, sendo adotada para análise a regra de Lipinski associada a Verber (Verber *et al.*, 2002). Podemos observar que apenas o alcaloide **2** violou um critério estabelecido pela Massa Molecular. Entretanto, todos os alcaloides apresentaram área de superfície polar e o número de receptores de hidrogênio foi adequado (Tabela 05).

As propriedades físico-químicas dos alcaloides permitem inferir como, teoricamente, serão os aspectos farmacocinéticos, isto é, moléculas com maior MM

como a Geissospermina (2) terão maior dificuldade em se distribuir para o SNC que moléculas menores (Jorgensen *et al.*, 2025). Ao avaliar as relações entre as ligações doadores (nDH) e aceptores (nAH) de hidrogênio e número de pontes rotacionáveis (nRP) observa-se que o alcaloide **2** apresentou um maior número de nRP (5), essa característica influencia na flexibilidade, permeabilidade, solubilidade, estabilidade metabólica e ligação ao alvo (Tabela 05; Veber *et al.*, 2002; Abdulhakim *et al.*, 2022). Embora uma certa flexibilidade seja benéfica para a ligação ao alvo, um excesso de pontes rotacionáveis pode comprometer a absorção e a estabilidade da molécula (Abdulhakim *et al.*, 2022).

Tabela 05 – Predição físico-química dos alcaloides encontrados nas cascas de *G. laeve*

Código	Nome	MM (g/mol)	nRP	nDH	nAH	Consenso do log P (O/A)	TPSA (Å ²)
1	Flavopeirerina	246,31	1	0	2	3,02	18,2
2	Geissospermina	632,37	5	1	7	3,46	61,04
3	Geissoschizina	352,18	3	2	5	2,92	66,56
4	Geissoschizolina	298,2	2	2	3	2,52	35,5
5	Geissoschizolina (N4) Metil cloro	352,43	3	2	3	2,17	32,26
6	Geissoschizolina (N4) Oxido	315,21	2	3	4	1,62	52,49

Legenda: MM: massa molecular; nRP: número de receptores de hidrogênio; nDH: número de doadores de hidrogênio; nAH: número de aceptores de hidrogênio; TSPA: área de superfície polar; log: logaritmo; O/A: óleo:água; Paramêtros: número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol; coeficiente de partição octanol-água (log P) menor ou igual a 5; área de superfície polar (TSPA) menor ou igual a 140 Å.

O LogP (logaritmo da constante de partição), demonstrou que todos os alcaloides são moderadamente lipofílicos, sugerindo que essas substâncias podem ser bem absorvidas pelas membranas celulares, que são compostas principalmente de lipídios, ainda, por serem moderadamente lipofílicos, podem apresentar certa solubilidade em água (Pantaleão *et al.*, 2021). A área de superfície polar (TPSA) também é um parâmetro relevante na avaliação de novos fármacos (Ertl; Rohde; Selzer, 2000). As TPSAs das moléculas variam entre 16,99 e 66,56 Å², indicando que todas estão dentro da faixa considerada favorável para permeabilidade.

Tabela 06 – Predição das propriedades farmacocinéticas dos compostos encontrados no espectro de CLAE-DAD, das cascas de *G. laeve*.

Código	Absorção			Distribuição		Metabolização	
	MDCK (nm/sec)	Caco2 (nm/sec)	gp-P	HIA	PP (%)	BHE	Fase I
1	Alta	Média	S	Alta	92	Alta	CYP1A2; CYP2D6
2	Baixa	Médio	NS	Alta	91	Baixo	CYP1A2; CYP2C19; CYP3A4
3	Média	Média	S	Alta	93	Alta	CYP3A4
4	Alta	Média	S	Alta	73	Alta	CYP1A2; CYP2C19; CYP3A4
5	Baixa	Baixa	S	Alta	83	Alta	-
6	Baixa	Baixa	S	Alta	73	Alta	CYP2C19

Legenda: Flavopeirerina (1), Geissospermina (2), Geissoschizina (3), Geissoschizolina (4), Geissoschizolina (N4) metil cloro (5) e Geissoschizolina (N4) óxido (6). MDCK: *Madin-Darby canine kidney*; gp-P: glicoproteína P; HIA: absorção intestinal; PP: proteínas plasmáticas; BHE: barreira hematoencefálica; CYP: citocromo; S: substrato; NS: não substrato. Parâmetros: HIA: 0-20% (baixa absorção), 20-70% (moderada absorção), >70% (elevada absorção); permeabilidade em células Caco2 e MDCK: alta permeabilidade em valores >70 nm/sec, de média permeabilidade 4-70 nm/sec e de baixa permeabilidade <4 nm/sec. Distribuição na Barreira hematoencefálica: 1 atravessa; 0 não atravessa.

Ao analisar as propriedades farmacocinéticas observa-se baixas permeabilidades para células MDCK e Caco2 para os alcaloides **5** e **6**. Também, baixa permeabilidade para células MDCK foi observada para o alcaloide **2** (Tabela 06). Entretanto, todos os alcaloides parecem ser bem absorvidos no trato gastrointestinal. Um fator preocupante é a ligação dos alcaloides a gp-P, excetuando a **2** (Tabela 06), pois esta proteína está amplamente distribuída no epitélio intestinal, em especial do intestino delgado, atuando como mecanismo de defesa pois limita a absorção de vários xenobióticos (Balimane, Chong, 2005, Jorgensen *et al.*, 2025), esta ligação alcaloide-gp-P pode reduzir a biodisponibilidade oral dos alcaloides. Neste contexto, são necessários estudos *in vivo* para avaliar a absorção e biodisponibilidade dos alcaloides.

Os alcaloides **1**, **2** e **3** ligam fortemente a proteína plasmática (Tabela 06), sendo os alcaloides moléculas com caráter básico podendo se ligar a glicoproteína α 1-ácida e a albumina (Keen, 1971; Stielow *et al.*, 2023). Desta forma, provavelmente, a associação com outro fármaco que se liga fortemente à albumina poderá ocasionar um menor impacto no equilíbrio da concentração do alcaloide livre e ligado às proteínas plasmáticas. Devido a maior massa molecular, somente o alcaloide **2** tem dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica (Tabela 06).

Apenas o alcaloide **5** não sofre metabolismo de fase 1 através das CYPs

(Tabela 06), que tem o objetivo tornar a molécula mais polar, facilitando sua excreção (Ramamoorthy, 2010; Werk; Cascorbi, 2014, Silva, 2015). Outro alcaloide, a morfina, sofre metabolismo de fase 2 obtendo-se o metabólito morfina-3-glicuronídeo (Pacifici, 2016), talvez o alcaloide 5 possa ser metabolizado através da conjugação com compostos endógenos. A inibição das enzimas do citocromo P450 (CYPs) está diretamente relacionada ao aumento do risco de eventos adversos e toxicidade medicamentosa, pois reduz a capacidade de metabolização de fármacos ativos, levando ao seu acúmulo sistêmico (Ramamoorthy, 2010; Werk; Cascorbi, 2014, Silva, 2015).

A metabolização pela CYP3A4 é mais crucial em termos farmacológicos, pois essa enzima é responsável pelo metabolismo de cerca de 50% dos fármacos em uso clínico. Sua atividade influencia diretamente a biodisponibilidade, eficácia e toxicidade de diversos medicamentos, sendo alvo de interações medicamentosas significativas (Werk; Cascorbi, 2014).

Os alcaloides **1** e **2** (Tabela 07), ativaram o receptor androgênico, sua ativação desempenha um papel crucial no desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas, além de influenciar processos como a síntese proteica, crescimento muscular e função reprodutiva (Leung; Tien; Sadar, 2021). Os alcaloides **1**, **4** e **5** ativaram o receptor aromatase, não é um receptor clássico, mas sim uma enzima (aromatase, CYP19A1) que converte andrógenos (como testosterona) em estrógenos (estrone e estradiol). Dessa forma, os alcaloides **1** e **2** podem ter potencial como moduladores androgênicos, mas com riscos de efeitos colaterais androgênicos excessivos. Além disso, os alcaloides **1**, **4** e **5** podem aumentar os estrogênios, o que pode ser indesejável em homens, mas teria implicações em condições específicas (ex.: reposição estrogênica).

O alcaloide **1** também se ligou ao receptor de hidrocarbonetos arila (NR-AhR, Tabela 07) que é um fator de transcrição, envolvido na regulação de genes associados à desintoxicação xenobiótica, inflamação, proliferação celular e homeostase imunológica (Moukheiber *et al.*, 2022).

Ativou o receptor de estrogênio (NR-ER) e seu domínio de ligação (NR-ER-LBD, Tabela 07), é um receptor nuclear que media os efeitos dos estrogênios (como estradiol, estrone e estriol), o NR-ER é essencial para funções reprodutivas, ósseas e cardiovasculares, mas exigem balanço entre benefícios e riscos, e ao ativar

também ao NR-ER-LBD, que é responsável pela interação com hormônios estrogênicos, moduladores seletivos (SERMs) e compostos antagonistas, oferece maior segurança (Arao; Korach, 2021).

Também ativou o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (NR-PPAR- γ , Tabela 07), que é um receptor nuclear que atua como um regulador principal do metabolismo lipídico e da diferenciação adipocitária, sendo assim, alvo crucial no controle do metabolismo energético e inflamação (Filgueiras *et al.*, 2024).

A ativação do alcaloide **1** do receptor do elemento de resposta antioxidante (SR-ARE) que também não é um receptor nuclear clássico, mas sim um elemento de resposta ao estresse oxidativo regulado pela via de sinalização do fator nuclear relacionado ao fator eritroide 2 (Nrf2), pode desempenhar um papel crucial na defesa celular contra danos oxidativos e na detoxificação de xenobióticos (Vomhof-Dekrey; Picklo, 2012; Liu; Zhang, 2022).

Ele também foi capaz de ativar a proteína supressora de tumor (SR-p53) que é um fator de transcrição que regula o ciclo celular, reparo de DNA e apoptose, juntos estão envolvidos na integridade do genoma (Lee *et al.*, 2013; Kastenhuber; Lowe, 2017).

Ainda, o alcaloide **1** ativou fator de transcrição de choque térmico (SR-HSE; Tabela 07), embora não seja um receptor de esteroides clássico, o sistema HSE/HSF1 está intimamente ligado à resposta ao estresse celular, incluindo proteção contra danos proteotóxicos, e interage com vias hormonais e de sinalização nuclear (Lang *et al.*, 2021). Por fim, ao ativar todos esses receptores, o alcaloide **1** ainda ativa o potencial de membrana mitocondrial (SR-MMP, Tabela 07) que é essencial para a produção de ATP, homeostase do cálcio e sobrevivência celular (Wu; Chen; Jiang, 2019).

Em um contexto farmacológico, a ativação dessas vias pode levar a um benefício em contextos específicos, garantido assim que, de forma global, o alcaloide **1** seja um promissor agente farmacológico. Entretanto, a ativação desses alvos sugere que o alcaloide **1** pode interferir em processos críticos, e essa ativação múltipla pode aumentar o risco de efeitos adversos, como desregulação endócrina, dano ao DNA, apoptose celular e toxicidade mitocondrial, podendo levar a consequências como carcinogenicidade, disfunção orgânica ou falência celular (Djukić-Ćosić, 2021), sendo necessário avaliar os riscos e os benefícios de sua

aplicação.

Tabela 07 – Avaliação da ativação de receptores nuclear pelos alcaloides isolados da casca de *G. laeve*

Código	1	2	3	4	5	6
NR-AR	P	P	N	N	N	N
NR-AR-LBD	N	N	N	N	N	N
NR-AhR	P	N	N	N	N	N
NR-Aromatase	P	N	N	P	P	N
NR-ER	P	N	N	N	N	N
NR-ER-LBD	P	N	N	N	N	N
NR-PPAR-gamma	P	N	N	N	N	N
SR-ARE	P	N	N	N	N	N
SR-ATAD5	N	N	N	N	N	N
SR-HSE	P	N	N	N	N	N
SR-MMP	P	N	N	N	N	N
SR-p53	P	N	N	N	N	N

Legenda: Flavopeirerina (1), Geissospermina (2), Geissoschizina (3), Geissoschizolina (4), Geissoschizolina (N4) metil cloro (5) e Geissoschizolina (N4) óxido (6). P: positivo; N: negativo; Receptor nuclear (NR); receptor androgênico e domínio de ligação a ligante do receptor androgênico (NR-AR/ NR-AR-LBD); receptor de hidrocarbonetos arila (NR-AhR); receptor estrogênico e domínio de ligação a ligante do receptor androgênico (NR-ER/NR-ER-LBD); receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (NR-PPAR-gamma); receptores dos elemento de resposta antioxidante (SR-ARE); receptores da proteína 5 contendo o domínio AAA da família ATPase (SR-ATAD5); fator de transcrição de choque térmico (SR-HSE); potencial de membrana mitocondrial (SR-MMP); e proteína supressora de tumor (SR-p53).

Na avaliação da toxicidade o alcaloide **3** foi o único que não foi classificado como mutagênico, enquanto que o **6** foi o menos tóxico aos organismos aquáticos. Os alcaloides **4**, **5** e **6** apresentaram baixo risco de ativação do canal hERG+ que prever a cardiotoxicidade (Tabela 08). Em um estudo de toxicidade em *Artemia salina* utilizando o extrato etanólico, a fração de neutros e a fração alcaloídica das

cascas de *G. vellosii*, os seguintes dados foram encontrados, o extrato etanólico e a fração de neutros foram consideradas tóxicas ($DL_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$) e a fração alcaloídica mostrou-se moderadamente tóxica ($DL_{50} > 150 \mu\text{g/mL}$) (Brandão, 2012). A Flavopereirina demonstrou em macrófagos ser mais seletiva e menos citotóxica quando se aumentou o tempo de exposição, apresentando uma baixa toxicidade (Silva, 2016).

Tabela 08 – Predição da toxicidade dos alcaloides isolados de *G. laeve*

Parâmetros Avaliados	Código					
	1	2	3	4	5	6
Toxicidade						
Algas	T	T	T	T	T	T
<i>Daphnia</i> sp.	T	T	T	NT	NT	NT
Peixes						
Medaka	MT	MT	MT	MT	MT	NT
<i>Minnow</i> sp.	MT	MT	MT	MT	MT	NT
Carcinogênico						
Ratos	P	P	N	N	N	N
Camundongos	N	N	P	N	N	N
Alterações Celulares						
AMES	P	P	N	P	P	P
	TA1535	TA100		TA1535	TA1535	TA1535
	NA	10RLI	-	NA	NA	NA
Cardiotoxicidade						
Inibição hERG	MR	MR	MR	BR	BR	BR

Legenda: Flavopeirerina (1), Geissospermina (2), Geissoschizina (3), Geissoschizolina (4), Geissoschizolina (N4) metil cloro (5) e Geissoschizolina (N4) óxido (6). Positivo (P); negativo (N); muito tóxico (MT); tóxico (T); não tóxico (NT); médio risco (MR); baixo risco (BR). Parâmetros: para toxicidade em algas - serão tóxicos valores $< 1 \text{ mg/L}$ e não tóxicos valores $> 1 \text{ mg/L}$; toxicidade em *Daphnia* sp - tóxico $< 0,22 \mu\text{g/mL}$ e não tóxico $> 0,22 \mu\text{g/mL}$; toxicidade em peixes Medaka e *Minnow* sp. - muito tóxico $< 1 \text{ mg/L}$, tóxico entre $1\text{-}10 \text{ mg/L}$, prejudiciais entre $10\text{-}100 \text{ mg/L}$ e não tóxico $> 100 \text{ mg/L}$.

Para verificar se os alcaloides atuam na transpeptidase PBP2a (PDB: 4CJN; Tabassum *et al.*, 2023) presentes na MRSA que é envolvida na síntese da parede celular bacteriana, catalisando a formação de ligações cruzadas entre peptidoglicanos, e se eles também podem interferir na regulação do fator de virulência de MRSA o sistema *Agr* (PDB: 4G4K; Leonard *et al.*, 2012) é um regulador transcricional que desempenha um papel crucial no sistema de *quorum sensing*

controlando a expressão de fatores de virulência, realizou-se estudos de ancoragem molecular.

Todos os alcaloides se ligam ao receptor PBP2a, sendo o alcaloide **1** foi a que obteve maior afinidade -7,87 kcal/mol (Tabela 09). Ressalta-se que em MRSA alteram essa a expressão do gene *mecA*, o que compromete a afinidade entre o receptor e os antimicrobianos (Lade; Kim, 2023), tornando a bactéria resistente. Entretanto, os alcaloides podem ligar a este receptor inibindo a síntese de parede levando a morte da bactéria. De forma similar o alcaloide **1**, se ligou de forma mais favorável ao domínio *AgrA LytTR*, com afinidade de -8,66 kcal/mol.

Tabela 09 – Alvos moleculares em MRSA e sua interação com os alcaloides isolados de *G. laeve*

PBP2a (4CJN)			
Código	Afinidade	E. vdW	Interação
1	-7,815	-17,879	Lys247, Asp249, His267, Asp269, Tyr271
2	-7,668	-19,462	Tyr79, Ile118; Asn120, Tyr271
3	-6,489	-2,065	Asn120, Glu119
4	-6,590	-1,996	Asn120, Asp249, Asp269
5	-6,878	-9,794	Asn120, Asp269, Asp249, Lys247
6	-6,735	-5,663	Asn120, Asp249
Domínio <i>AgrA LytTR</i> (4G4K)			
1	-8,662	-24,714	A:Tyr89, B:Tyr15, B:Asp20
2	-7,664	-16,943	A:Lys76, A:Arg78, B:Asn39
3	-7,277	-13,787	A:Arg78, B:Gln41
4	-7,834	-19,028	A:Gln39, B:Ser1
5	-7,023	-9,299	B:The4, B:Tyr15
6	-7,219	-16,042	A:Asn37, A:Asn84, A:Glu86

Legenda: Flavopeirerina (1), Geissospermina (2), Geissoschizina (3), Geissoschizolina (4), Geissoschizolina (N4) metil cloro (5) e Geissoschizolina (N4) óxido (6).

As interações observadas entre a molécula **1** e a proteína PBP2a (4CJN, Figura 23.A), podemos notar a presença de ligações do tipo hidrofóbicas com o resíduo com tirosina 271 e histidina 267, além de apresentar ligações de ponte de hidrogênio com aspartato 269 e eletrostática com lisina 247 e aspartato 249, demonstrando também interações do tipo forças de Van de Waals, com vários resíduos do sítio. As interações entre a molécula **1** com o gene *argA* (4G4K, Figura 23.B) foram evidenciadas por ligações do tipo ponte de hidrogênio com o resíduo de tirosina 15 (cadeia B), ligações do tipo hidrofóbicas com o resíduo tirosina 89 (cadeia A) e eletrostática com aspartato 20 (cadeia B).

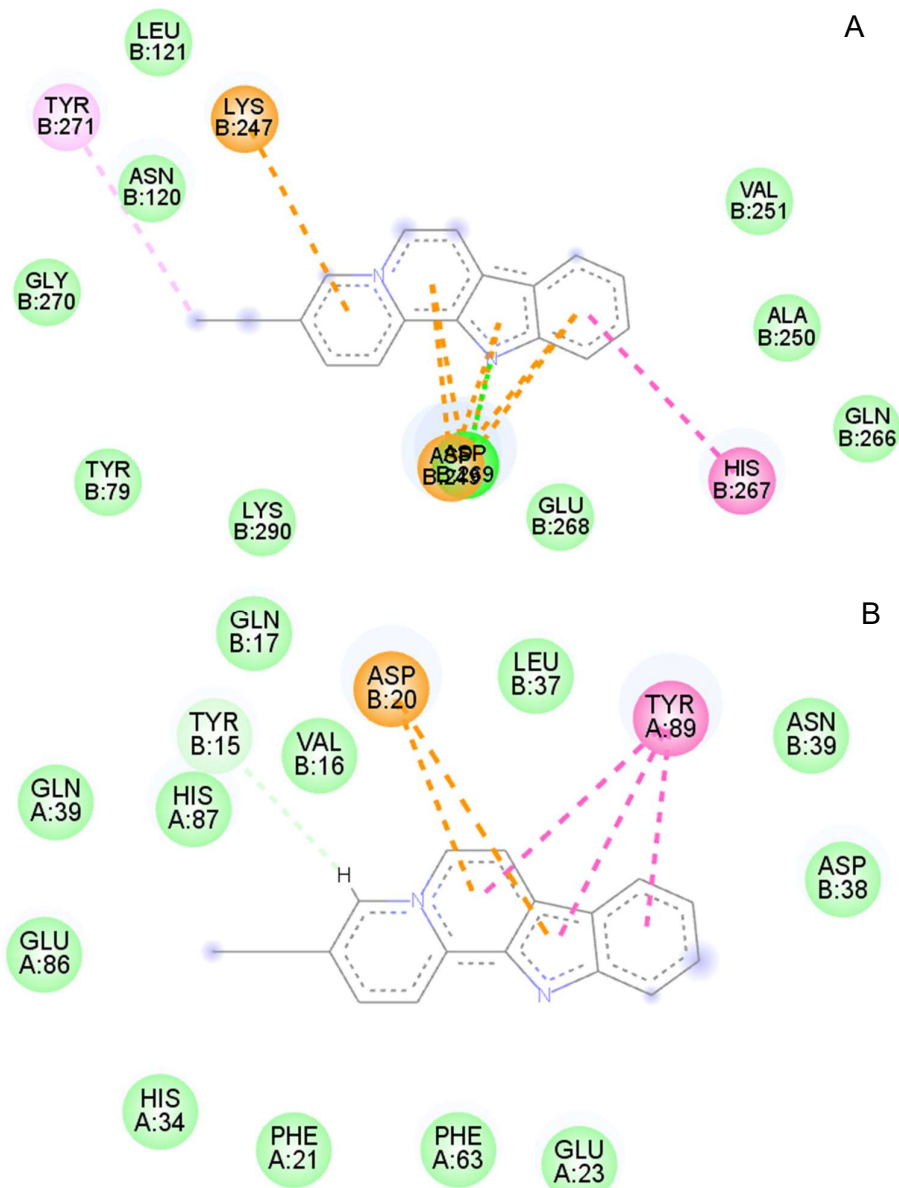


Figura 23 – Diagrama 2D das interações molecular entre a flavopereirina e seus alvos demonstrando suas interações.

Legenda: A: 4CJN; B: 4G4K.

Ao se correlacionar os resultados da docagem molecular a seletividade para receptores e a toxicidade, observa-se que o alcaloide **1** foi mais promissor, porém a menos seletivo, podendo se ligar a diferentes receptores do hospedeiro, podendo ocasionar diferentes eventos adversos. Logo, não parece ser a molécula mais promissora para o tratamento do MRSA. As maiores seletividades foram observadas

para os alcaloides **3** e **6**, que também se ligaram de forma favorável às duas proteínas. Investigações in vitro da citotoxicidade, genotoxicidade destas moléculas, bem como a avaliação da atividade anti-estafilocócica são importantes, podendo ser estabelecido o índice de seletividade. Ao final, pode-se obter 2 promissores candidatos a fármacos para a MRSA.

Diferente do observado para MRSA, as amostras de *G. laeve* não se mostrou ativa para *E. coli*, entretanto a FAGL, quando associada ao Imipenem, produziu um efeito sinérgico no isolado produtor de carbapenases (KPC e NDM). Desta forma, a premissa inicial é que estes alcaloides possam inibir as carbapenases (KCP [PDB: 5UJ3; Klein *et al.*, 2018] e NDM-1 [PDB: 5ZGE; Rahman; Khan, 2020]) ou se inibem genes envolvidos na produção do biofilme a partir do gene *LuxS* (PDB: 2FQT; Shen *et al.*, 2006), podendo ser associado ao Imipenem para o tratamento de bactérias produtoras de NDM e KPC.

Todas os alcaloides se ligaram de forma favorável, entretanto o alcaloide **2** demonstrou maior afinidade de ligação com a enzimas KPC, e a **3** para a enzima NDM, com valores de -9,11 kcal/mol e -8,36 kcal/mol, respectivamente (Tabela 10). Para o gene *LuxS* as afinidades foram bem similares, mas o alcaloide **1** apresentou melhor afinidade com -7,99 kcal/mol.

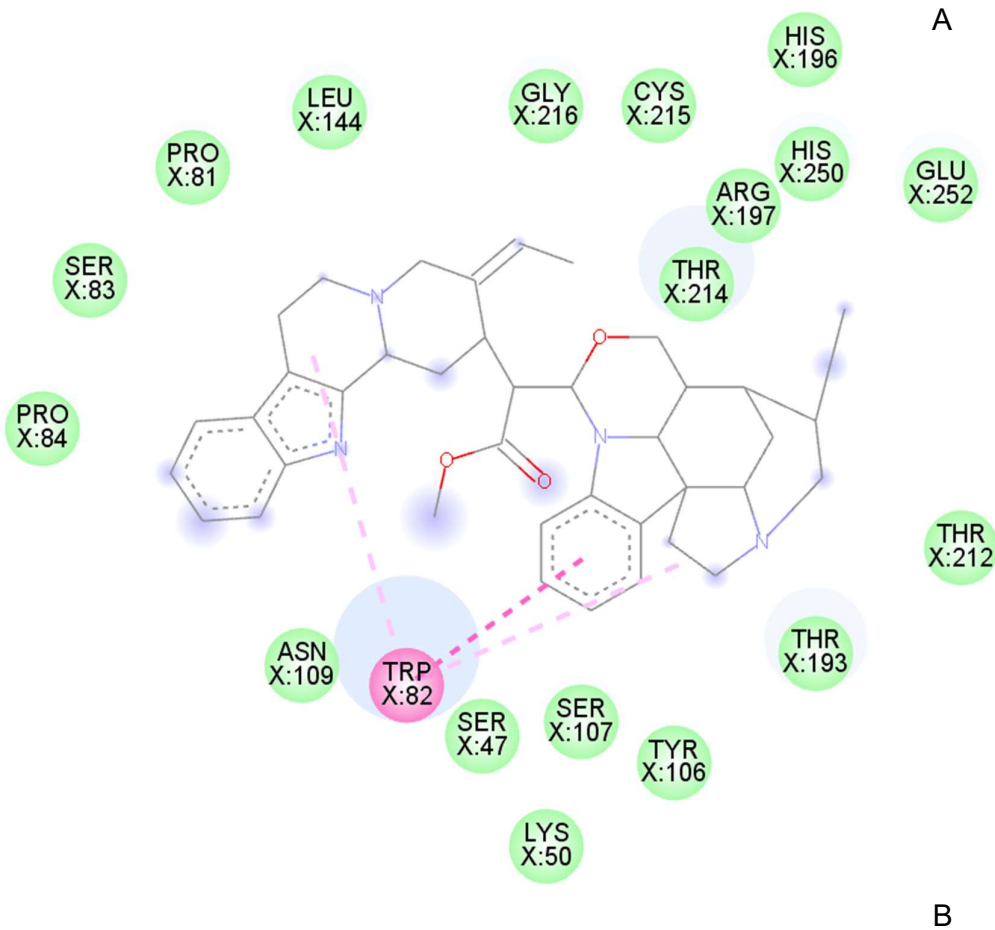
Tabela 10 – Alvos moleculares em *E. coli* e sua interação com os alcaloides isolados de *G. laeve*

KPC (5UJ3)			
1	-8,263	-21,540	Trp82, Leu144
2	-9,110	38,289	Trp82
3	-7,355	-11,328	Trp82, Thr214, Asn109, Leu144
4	-7,707	-16,663	Asn147, Thr214, Leu144
5	-7,857	-14,544	Trp82, Asn109
6	-7,799	-12,918	Trp82, Asn109, Leu144
NDM-1 (5ZGE)			
1	-7,898	-17,015	Lys182
2	-8,052	-17,619	Ser188
3	-8,366	-22,495	Lys182, Asp183, Ala186, Ser188, His221
4	-8,125	-16,758	Asp183, Ala186, His221
5	-8,019	-20,414	Ile6, Lys182, Ser188
6	-8,081	-20,928	Ile6, Lys182, Asp183, Lys187, Ser188, Ser222
Gene <i>LuxS</i> (2FQT)			
1	-7,992	-17,896	Ile50, Hist51, Glu54, His55, Pro78
2	-7,979	-20,054	Hist51, Glu54, Pro78
3	-7,229	-9,753	Hist51, Glu54, Pro78

4	-7,619	-13,461	Glu54, Ala58, Asp75
5	-7,210	-11,050	Glu54, Ala58, Asp75, Ile76, Cys123,
6	-7,147	-7,700	Ile50, Hist51, Glu54

Legenda: Flavopeirerina (1), Geissospermina (2), Geissoschizina (3), Geissoschizolina (4), Geissoschizolina (N4) metil cloro (5) e Geissoschizolina (N4) óxido (6).

As interações apresentadas entre a molécula **2** e a enzima KPC (5UJ3, Figura 24.A) demonstraram apenas ligações do tipo hidrofóbicas com os resíduos triptofano 82 além de realizar interações do tipo forças de Van de Waals. As interações apresentadas pela molécula **3** e a enzima NDM-1 (5ZGE, Figura 24.B) demonstram ligações do tipo ponte de hidrogênio com o resíduo serina 188 e aspartato183 e do tipo hidrofóbicas com os resíduos alanina 186, lisina 182 e histidina 221. Com o gene *LuxS* (2FQT) a molécula **1** apresentou ligações do tipo ponte de hidrogênio de glutamato 54, do tipo hidrofóbicas com os resíduos de isoleucina 50, histidina 51, histidina 55 e prolina 78 e eletroestática com glutamato 54 (Figura 24.C).



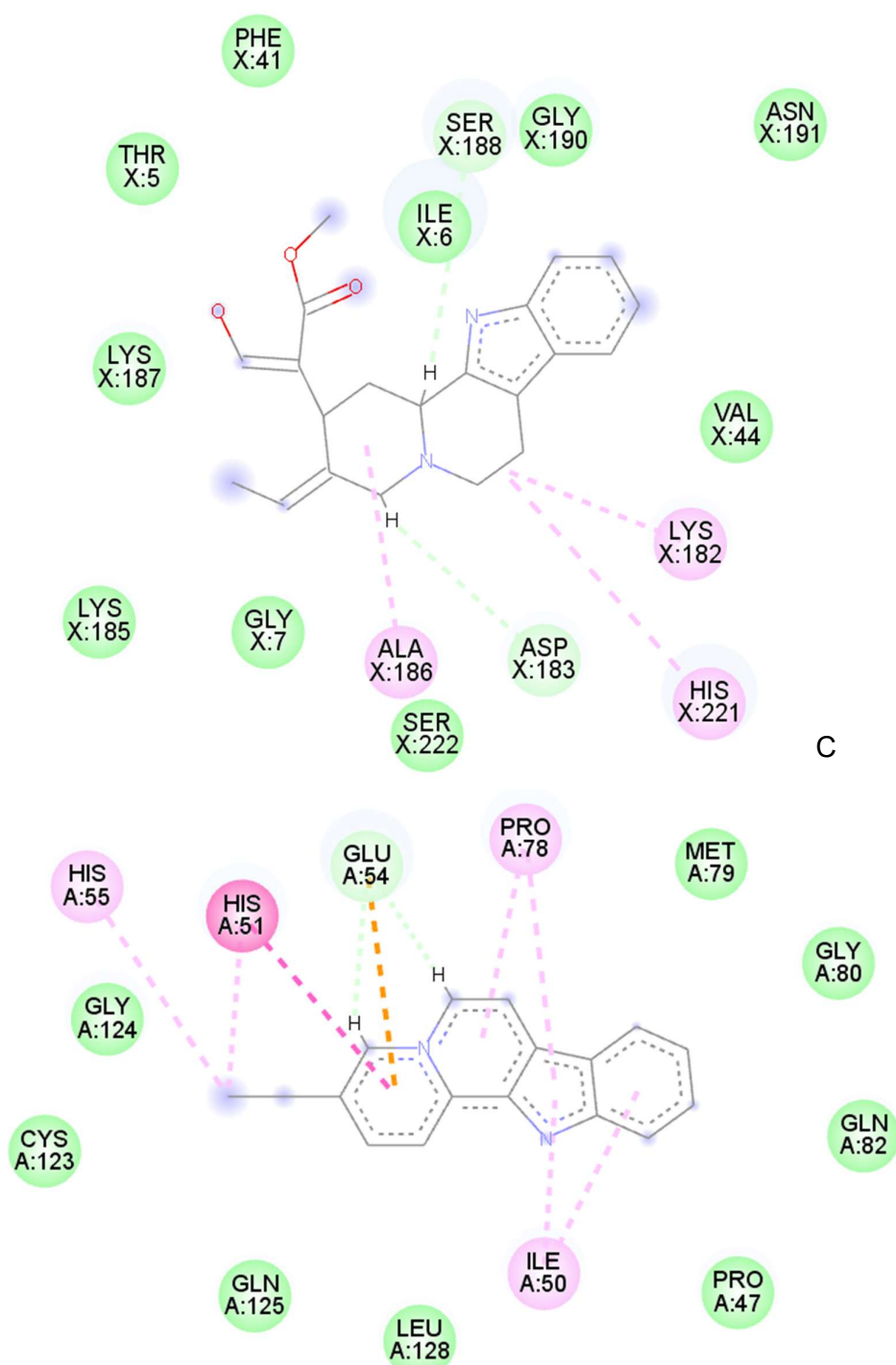


Figura 24 – Diagrama 2D das interações moleculares entre os alcaloides e seus alvos demonstrando suas interações.

Legenda: A: Geissospermina - 5UJ3; B: Geissoschizina - 5ZGE; C Flavopereirina - 2FQT.

Para a *E. coli*, não houve uma unidade entre os alcaloides, o que pode demonstrar porque a FAGL levou ao efeito sinérgico, visto que, a mistura desses

alcaloides pode levar a múltiplas respostas farmacológicas. Essa análise demonstrou a relevância desses alcaloides para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos e moduladores alostéricos de PBP2a e inibidores da NDM-1 e KCP, além de interagirem os componentes do QS, podendo interferir nestes, causando prejuízo a formação do biofilme.

5 CONCLUSÃO

O fracionamento permitiu ampliar a atividade antimicrobiana de *G. laeve*, onde foi possível observar que a FAGL foi mais ativa que o EEGL, frente a *S. aureus*. Sobre o efeito sinérgico, a FAGL também apresentou melhores resultados, sendo capaz inclusive que propiciar a redução da concentração do Imipenem frente a *E. coli* (IEC-BAC 58932 coprodutora de NDM-KPC). Com base nos estudos *in silico*, podemos inferir que os alcaloides Geissoschizina e Geissoschizolina (N4) óxido são alcaloides promissores para a atividade antimicrobiana e como adjuvantes terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- ABDULHAKIM, Jawaher Abdualbaqi. Effect of guggulsterone, a sterol identified in *Commiphora gileadensis* (Becham), on the dengue virus enzymes: Pharmacokinetics, molecular docking and molecular dynamics simulations studies, **Journal of King Saud University-Science**, v. 34, n, 6, p. 102140, 2022.
- ABUSHAHEEN, Manar Ali et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance, **Disease-a-Month**, v. 66, n, 6, p. 100971, 2020.
- AIGOTTI, Riccardo et al. Characterization of alkaloids in bark extracts of *Geissospermum vellosii* by HPLC-UV-diode array-multistage high-resolution mass spectrometry, **Journal of Chromatography B**, v. 1203, p. 123307, 2022.
- ALEXANDER, J, Andrew N, et al. Structural basis of broad-spectrum β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*, **Nature**, v. 613, n, 7943, p. 375-382, 2023.
- ALI KHAN, Mohammed Safwan et al. Prostaglandin analogous and antioxidant activity mediated gastroprotective action of *Tabernaemontana divaricata* (L.) R, Br, flower methanolic extract against chemically induced gastric ulcers in rats, **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- ALLEN, Heather K.; STANTON, Thad B. Altered egos: antibiotic effects on food animal microbiomes, **Annual review of microbiology**, v. 68, p 297-315, 2014.
- ALMEIDA, Alessandro Lopes; SILVA ARAÚJO, Anna Clícia Lopes; COSTA, Gleyce Kellen Monteiro. Consequências do uso irracional de azitromicina durante a pandemia de COVID-19, **Research, Society and Development**, v. 11, n, 16, p. e512111638771-e512111638771, 2022.
- ALMEIDA, Larissa Santos de. **Produtos florestais não madeireiros em área manejada**: análise de uma comunidade na região de influência da BR 163, Santarém, Estado do Pará, 2010, 128f, Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal Rural da Amazônia/UFRA, Belém, 2010.
- ALMEIDA, Márcia R, et al, Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v, 19, p, 942-952, 2009.
- ARAI, Hiroko et al, Alstiphyllanines I–O. ajmaline type alkaloids from *Alstonia macrophylla* showing vasorelaxant activity, **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n, 11, p. 3454-3459, 2012.
- ARAO, Yukitomo; KORACH, Kenneth S. The physiological role of estrogen receptor functional domains. **Essays in biochemistry**, v. 65, n. 6, p. 867-875, 2021.
- ARNOLD, Brian J.; HUANG, I,-Ting; HANAGE, William P. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria, **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n, 4, p. 206-218, 2022.
- ASSONI, Lucas et al. Resistance mechanisms to antimicrobial peptides in gram-positive bacteria, **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p, 2362, 2020.
- BAGGIO, Cristiane Hatsuko et al. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*, **Planta medica**, v. 71, n, 08, p. 733-738, 2005.
- BALIMANE, Praveen V.; CHONG, Saeho. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug discovery today**, v. 10, n. 5, p. 335-343, 2005.
- BASTOS, Mirian Letícia Carmo et al. Alkaloid from *Geissospermum sericeum* Benth,

& Hook, f, ex Miers (Apocynaceae) Induce Apoptosis by Caspase Pathway in Human Gastric Cancer Cells, **Pharmaceuticals**, v. 16, n, 5, p. 765, 2023.

BASTOS, Mirian Letícia Carmo. **Avaliação da citotoxicidade e seletividade do extrato, frações e alcaloide de *Geissospermum sericeum* (Apocynaceae) em linhagens celulares ACP02, HepG2 e VERO**, 2017, 108f, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2017.

BEACHAM, I. R. Periplasmic enzymes in gram-negative bacteria. **International Journal of Biochemistry**, v. 10, n. 11, p. 877-883, 1979.

BEMIS, Debra L, et al. β -Carboline alkaloid-enriched extract from the Amazonian rain forest tree pao Pereira suppresses prostate cancer cells, **Journal of the Society for Integrative Oncology**, v. 7, n, 2, p. 59, 2009.

BENNETT, Peter M. Integrins and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n, 1, p. 1-4, 1999.

BERTANIA, S, et al. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n, 1-2, p. 45-54, 2005.

BHADANE, Bhushan S, et al. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review, **Phytotherapy research**, v. 32, n, 7, p. 1181-1210, 2018.

BOOTON, Ross D, et al. One Health drivers of antibacterial resistance: quantifying the relative impacts of human, animal and environmental use and transmission, **One Health**, v. 12, p. 100220, 2021.

BRANDÃO, Dayse Lúcia do Nascimento. ***Portulaca pilosa* L, e *Geissospermum velosii* Leavis: estudos botânicos, farmacognóstico, fitoquímico e atividades biológicas**, 2012, 128f, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.

BRANDÃO, Maria GL et al. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 478-487, 2009.

BRAWLEY, Douglas N, et al. Structural basis for inhibition of the drug efflux pump NorA from *Staphylococcus aureus*, **Nature chemical biology**, v. 18, n, 7, p. 706-712, 2022.

BrCAST – Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos -, Disponível em: <<https://brcast.org.br/>>, 2024.

BUSH, Karen. Classification for β -lactamases: historical perspectives, **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 21, n, 5, p. 513-522, 2023.

BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens, **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n, 2, p. 10,1128/cmr, 00047-19, 2020.

CAMARGO, Marlene Rodrigues Marcelino. **Avaliação da atividade antimalárica e antimicrobiana de *Geissospermum argenteum* Woodson e *Minguartia guianensis* Aubl coletadas em Roraima**, 2011, 99f, Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais,

Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2011.

CARATTOLI, Alessandra. Importance of integrons in the diffusion of resistance, **Veterinary research**, v. 32, n. 3-4, p.243-259, 2001.

CHASSAGNE, Francois et al. A systematic review of plants with antibacterial activities: A taxonomic and phylogenetic perspective, **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 2069, 2021.

CHEENPRACHA, Sarot et al. Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking study of steroidal alkaloids from *Holarrhena pubescens* barks, **Steroids**, v. 108, p. 92-98, 2016.

CHEESMAN, Matthew J, et al. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution?, **Pharmacognosy reviews**, v. 11, n. 22, p. 57, 2017.

CHU, Ming et al. Role of berberine in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections, **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 24748, 2016.

CIMANGA, Kanyanga et al. New alkaloids from *Cryptolepis sanguinolenta*, **Tetrahedron letters**, v. 37, n. 10, p. 1703-1706, 1996.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, 11th ed, CLSI standard M07, Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

COLCLOUGH, Abigail L. et al. RND efflux pumps in Gram-negative bacteria; regulation, structure and role in antibiotic resistance. **Future microbiology**, v. 15, n. 2, p. 143-157, 2020.

COSTA, Sofia Santos et al. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update, **The open microbiology journal**, v. 7, p. 59, 2013.

COSTERTON, J, William; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E, Peter. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, **science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

CROFT, Arthur C.; D ANTONI, Anthony V.; TERZULLI, Stephanie L. Update on the antibacterial resistance crisis, **Medical science monitor**, v. 13, n. 6, p. RA103, 2007,

D'AMBROSIO, Francesco et al. Adherence to Antibiotic Prescription of Dental Patients: The Other Side of the Antimicrobial Resistance, **Healthcare**, v. 10, n. 9, p. 1636, 2022.

DABHADKAR, Dinesh; ZADE, Varsha. Abortifacient activity of *Plumeria rubra* (Linn) pod extract in female albino rats, **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 50, n. 10, p. 702–707, 1 out, 2012

DARBY, Elizabeth M, et al, Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited, **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 280-295, 2023.

DARWICH, Adam, et al. Interplay of metabolism and transport in determining oral drug absorption and gut wall metabolism: a simulation assessment using the “Advanced Dissolution, Absorption, Metabolism (ADAM)” model, **Current drug metabolism**, v. 11, n. 9, p. 716-729, 2010.

DAS, Sharmistha et al. Piperine, a phytochemical prevents the biofilm city of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a biochemical approach to understand

the underlying mechanism, **Microbial Pathogenesis**, v. 189, p. 106601, 2024.

DATTA, Susmita; NAG, Soma; ROY, Dijendra Nath. Biofilm-producing antibiotic-resistant bacteria in Indian patients: a comprehensive review, **Current Medical Research and Opinion**, v. 40, n. 3, p. 403-422, 2024.

DAVIES, David T.; EVERETT, Martin. Designing inhibitors of β -lactamase enzymes to overcome carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, n. 9, p. 2055-2064, 2021.

DAVIN-REGLI, Anne; PAGÈS, Jean-Marie; VERGALLI, Julia. The contribution of porins to enterobacterial drug resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 79, n. 10, p. 2460-2470, 2024.

DAVLIEVA, Milya et al. Biochemical characterization of cardiolipin synthase mutations associated with daptomycin resistance in *Enterococci*, **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 289-296, 2013.

DE LENCASTRE, Herminia et al. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 33, n. 1, p. 7-24, 1994.

DEPARDIEU, Florence et al. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression, **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 1, p. 79-114, 2007

DEY, Abhijit; MUKHERJEE, Anuradha; CHAUDHURY, Madhubrata. Alkaloids from Apocynaceae: origin, pharmacotherapeutic properties, and structure-activity studies, **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 52, p. 373-488, 2017.

DIAS, Josiane de Fátima Gaspari. **Fitoquímica e ensaios biológicos do extrato bruto etanólico, frações e substâncias isoladas provenientes das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocynaceae)**, 2012, 135f, Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Curitiba, 2012.

DING, Cai-Feng et al. Antibacterial indole alkaloids with complex heterocycles from *Voacanga africana*, **Organic letters**, v. 20, n. 9, p. 2702-2706, 2018.

DJUKIĆ-ĆOSIĆ, Danijela et al. In silico toxicology methods in drug safety assessment, **Archives of Pharmacy**, v. 71, n. Notebook 4, p. 257-278, 2021.

ELOFF, Jacobus Nicolaas. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria, **Planta medica**, v. 64, n. 08, p. 711-713, 1998.

ERTL, Peter; ROHDE, Bernhard; SELZER, Paul. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties, **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 20, p. 3714-3717, 2000.

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing -, Disponível em: < <https://www.eucast.org/>>.

FAN, Catherine et al. Defensive function of transposable elements in bacteria, **ACS Synthetic Biology**, v. 8, n. 9, p. 2141-2151, 2019.

FENG, Liang et al. A combination of alkaloids and triterpenes of *Alstonia scholaris* (Linn.) R, Br, leaves enhances immunomodulatory activity in C57BL/6 mice and

induces apoptosis in the A549 cell line, **Molecules**, v. 18, n, 11, p. 13920-13939, 2013.

FENNER, Raquel et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 369-394, 2006.

FLEMMING, Hans-Curt et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life, **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n, 9, p. 563-575, 2016.

FILGUEIRAS, Livia Alves et al. Analysis of SIKVAV's receptor affinity, pharmacokinetics, and pharmacological characteristics: a matrikine with potent biological function. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-23, 2024.

GHERARDI, Giovanni, Staphylococcus aureus infection: pathogenesis and antimicrobial resistance, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n, 9, p. 8182, 2023.

GOMES, Sara Wilis Cussuol. **Avaliação de aspectos relacionados à virulência de cepas multidroga-resistentes de *Corynebacterium amycolatum* isoladas de trato urinário de pacientes ambulatoriais**, 2022, 132f, Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

GRENNI, Paola; ANCONA, Valeria; CARACCILO, Anna Barra. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review, **Microchemical Journal**, v. 136, p. 25-39, 2018.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, Erick Paul et al. Plant alkaloids: Structures and bioactive properties, In: **Plant-Derived Bioactives: Chemistry and Mode of Action**, p. 85-117, 2020.

HAN, Jiarun et al. Insight into the structure, biosynthesis, isolation method and biological function of teichoic acid in different gram-positive microorganisms: A review, **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 126825, 2023.

HASSAN, Karl A, et al. Homologs of the Acinetobacter baumannii Acel transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems, **MBio**, v. 6, n, 1, p. 10,1128/mbio, 01982-14, 2015.

HU, Yongfei; GAO, George F.; ZHU, Baoli. The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings, **Frontiers of medicine**, v. 11, p. 161-168, 2017.

HUGHES, Neil A.; RAPOPORT, Henry. Flavopereirine, an alkaloids from *Geissospermum vellosii*, **Journal of the American Chemical Society**, v, 80, n, 7, p, 1604-1609, 1958.

ISHIYAMA, Haruaki; MATSUMOTO, Miyako; SEKIGUCHI, Mitsuhiro, Two new indole alkaloids from *Aspidosperma subincanum* and *Geissospermum vellosii*, **Heterocycles: an international journal for reviews and communications in heterocyclic chemistry**, v. 66, p. 651-658, 2005.

ISLAM, Kamrul et al. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase and metallo- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in South Asia, **Future Microbiology**, v. 16, n, 7, p. 521-535, 2021.

JORGENSEN, Christian et al. Permeability benchmarking: guidelines for comparing in silico, in vitro, and in vivo measurements, **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2025.

KAPER, James B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry LT. Pathogenic *Escherichia coli*, **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KASTENHUBER, Edward R.; LOWE, Scott W. Putting p53 in context. **Cell**, v. 170, n. 6, p. 1062-1078, 2017.

KEEN, P. Effect of binding to plasma proteins on the distribution, activity and elimination of drugs, In: **Concepts in Biochemical Pharmacology**: Part 1, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1971, p. 213-233.

KLEIN, Raphael et al. In silico identification and experimental validation of hits active against KPC-2 β -lactamase, **PLoS One**, v. 13, n. 11, p. e0203241, 2018.

KOSTAL, Jakub; VOUTCHKOVA-KOSTAL, Adelina. Going all in: a strategic investment in in silico toxicology, **Chemical research in toxicology**, v. 33, n. 4, p. 880-888, 2020.

KOUTSOUMANIS, Konstantinos et al. Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain, **EFSA Journal**, v. 19, n. 6, jun, 2021.

KUMAR, Arthanari Saravana et al. Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline, ||| **Bangladesh Journal of Pharmacology**|||, v. 4, n. 1, p. 13-16, 2009.

LADE, Harshad; KIM, Jae-Seok. Molecular determinants of β -lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): an updated review, **Antibiotics**, v. 12, n. 9, p. 1362, 2023.

LAMBERT, P, A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria, **Journal of applied microbiology**, v. 92, n, s1, p. 46S-54S, 2002.

LANG, Benjamin J. et al. The functions and regulation of heat shock proteins; key orchestrators of proteostasis and the heat shock response. **Archives of toxicology**, v. 95, n. 6, p. 1943-1970, 2021.

LEE, Kyoo-young et al. ATAD5 regulates the lifespan of DNA replication factories by modulating PCNA level on the chromatin. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 1, p. 31-44, 2013.

LEETEN, Kirsten et al. Ticagrelor alters the membrane of *Staphylococcus aureus* and enhances the activity of vancomycin and daptomycin without eliciting cross-resistance, **Mbio**, v. 15, n. 10, p. e01322-24, 2024.

LEUNG, Jacky K.; TIEN, Amy H.; SADAR, Marianne D. Androgen receptors in the pathology of disease. In: **Nuclear Receptors: The Art and Science of Modulator Design and Discovery**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 411-461.

LEONARD, Paul G, et al. Identification of a hydrophobic cleft in the LytTR domain of AgrA as a locus for small molecule interactions that inhibit DNA binding, **Biochemistry**, v. 51, n. 50, p. 10035-10043, 2012.

LIMA, Joselia A, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a

Geissospermum vellosii stem bark fraction, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 237-248, 2016.

LIPINSKI, Christopher A, Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution, **Drug discovery today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337-341, 2004.

LIU, Shengnan; PI, Jingbo; ZHANG, Qiang. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway. **Redox biology**, v. 54, p. 102389, 2022.

LOGAN, Latania K.; WEINSTEIN, Robert A. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace, **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n, suppl_1, p. S28-S36, 2017.

LOUNASMAA, Mauri; NEMES, András. The synthesis of bis-indole alkaloids and their derivatives. **Tetrahedron**, v. 38, n. 2, p. 223-243, 1982.

MADDAMSETTI, Rohan et al. Duplicated antibiotic resistance genes reveal ongoing selection and horizontal gene transfer in bacteria, **Nature Communications**, v. 15, n, 1, p. 1449, 2024.

MAGIORAKOS, Annapelle Pelagia, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n, 3, p. 268-281, 2012.

MALANOVIC, Nermina; LOHNER, Karl. Antimicrobial peptides targeting gram-positive bacteria, **Pharmaceutics**, v. 9, n, 3, p. 59, 2016.

MANICKAM, Kanchana et al. CHROMagar Orientation medium reduces urine culture workload, **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n, 4, p. 1179-1183, 2013.

MARI-ALMIRALL, Marta et al. Dissemination of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* high-risk clones in Catalan healthcare institutions, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n, 2, p. 345-354, 2021.

MARION, Leo. Chapter XIII The indole alkaloids, In: **The Alkaloids: Chemistry and Physiology**, Academic press, 1952, p. 369-498.

MARIZ, Monique Monteiro Pinto. **Ação do extrato etanólico da *Hymenaea martiana* na produção de biofilme e aderência de *Aeromonas* spp.**, 2018, 87 f, Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MARQUES, Lara et al. Advancing precision medicine: a review of innovative in silico approaches for drug development, clinical pharmacology and personalized healthcare, **Pharmaceutics**, v. 16, n, 3, p. 332, 2024.

MARTIN, Nicolas J, et al. Indole alkaloids from the Marquesan plant *Rauvolfia nukuhivensis* and their effects on ion channels, **Phytochemistry**, v. 109, p. 84-95, 2015.

MARTÍNEZ, Melina MB et al. On the offensive: the role of outer membrane vesicles in the successful dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1), **Mbio**, v. 12, n, 5, p. 10,1128/mbio, 01836-21, 2021.

MASI, Muriel et al. Cephalosporin translocation across enterobacterial OmpF and OmpC channels, a filter across the outer membrane. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 1059, 2022.

MBEUNKUI, Flaubert et al. In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n, 2, p. 471-477, 2012.

MCDANIEL, Lauren D, et al, High frequency of horizontal gene transfer in the oceans, **Science**, v. 330, n, 6000, p. 50-50, 2010.

MERLINO, John et al, Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species, **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n, 7, p. 1788-1793, 1996.

MIGLIORINI, L, B, et al. Prevalence of blaKPC-2, blaKPC-3 and blaKPC-30—Carrying Plasmids in *Klebsiella pneumoniae* Isolated in a Brazilian Hospital, **Pathogens**, v. 10, n, 3, p. 332, 1 mar, 2021.

MIZDAL, Caren Rigon et al. Molecular docking, and anti-biofilm activity of gold-complexed sulfonamides on *Pseudomonas aeruginosa*, **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 393-400, 2018.

MOK, Shiueh-Lian et al, Cardiovascular effects of aspidofractinine-type alkaloids from *Kopsia*, **Journal of natural products**, v. 61, n, 3, p. 328-332, 1998.

MONTEIRO, Ricardo et al. How different is the proteome of the extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* strains from seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal?, **Journal of proteomics**, v. 145, p. 167-176, 2016.

MOORE, Richard E.; RAPOPORT, Henry; Geissovelline, a new alkaloid from *Geissospermum vellosii*, **The Journal of Organic Chemistry**, v. 38, n, 2, p. 215-230, 1973.

MOUKHEIBER, Lama et al. Identifying protein features and pathways responsible for toxicity using machine learning and tox21: Implications for predictive toxicology. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 3021, 2022.

MUKHRAM, Mohd Azeemuddin et al; Anti-fertility effect of flower extracts of *Tabernaemontana divaricata* in rats, **Chinese journal of natural medicines**, v. 10, n, 1, p. 58-62, 2012.

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of antibiotic resistance, **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**, p. 481-511, 2016.

MUÑOZ, V, et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach: Part I, Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n, 2, p. 127-137, 2000.

MURRAY, Christopher JL et al, Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, **The Lancet**, v. 399, n, 10325, p. 629-655, 2022.

NOGUEIRA, Lavouisier Franklin Brito. **Avaliação da atividade antibacteriana e sinérgica da curcumina com oxacilina e vancomicina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes a metilicina (MRSA), e análise do seu mecanismo de ação**, 2019, 63f, Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, 2019.

NORD, Christina et al. Antibacterial isoquinoline alkaloids from the fungus *Penicillium spathulatum* Em19, **Molecules**, v. 24, n, 24, p. 4616, 2019.

NORDMANN, Patrice et al. The emerging NDM carbapenemases, **Trends in microbiology**, v. 19, n. 12, p. 588-595, 2011.

OLIVEIRA, F, M, M, Vegetaes tônicos. **Rio de Janeiro: Typographia da Revista do Exército Brasileiro**, 1883.

OLIVEIRA, F, Q, et al. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira, **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 5, n. 2, p. 23-31, 2003.

OLIVEIRA-TINTINO, Cícera D, et al. NorA, Tet (K), MepA, and MsrA efflux pumps in *Staphylococcus aureus*, their inhibitors and 1, 8-naphthyridine sulfonamides, **Current Pharmaceutical Design**, v. 29, n. 5, p. 323-355, 2023.

ONDUSKO, Devlynne S,; NOLT, Dawn. *Staphylococcus aureus*, **Pediatrics in review**, v. 39, n. 6, p. 287-298, 2018.

PACIFICI, Gian Maria. Metabolism and pharmacokinetics of morphine in neonates: A review. **Clinics**, v. 71, n. 8, p. 474-480, 2016.

PAKBIN, Babak; BRÜCK, Wolfram M,; ROSSEN, John WA. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review, **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 18, p. 9922, 2021.

PANDEY, Shanti; SAHUKHAL, Gyan S,; ELASRI, Mohamed O. The msaABCR operon regulates the response to oxidative stress in *Staphylococcus aureus*, **Journal of bacteriology**, .v. 201, n. 21, p. 10,1128/jb, 00417-19, 2019.

PANTALEÃO, Simone; FERNANDES, Philipe; GONÇALVES, José Eduardo; MALTAROLLO, Vinícius; HONORIO, Kathia. Recent advances in the prediction of pharmacokinetics properties in drug design studies: a review. **ChemMedChem**, v. 17, n. 1, p. e202100542, 2022.

PARAI, Debaprasad et al. Reserpine attenuates biofilm formation and virulence of *Staphylococcus aureus*, **Microbial Pathogenesis**, v. 138, p. 103790, 2020,

PATIL, Ravindra H,; PATIL, Mohini P,; MAHESHWARI, Vijay L. **Apocynaceae Plants: Ethnobotany, Phytochemistry, Bioactivity and Biotechnological Advances**, Springer Nature, 2023.

PEREIRA, Maria de M, et al. Indole alkaloids from species of the *Aspidosperma* (Apocynaceae) genus, **Química Nova**, v. 30, p. 970-983, 2007,

PHILIPPON, Alain et al. Class C β -lactamases: molecular characteristics, **Clinical microbiology reviews**, v. 35, n. 3, p. e00150-21, 2022.

PHILIPPON, Alain; SLAMA, Patrick Slama; DÉNY, Paul; LABIA, Roger. A structure-based classification of class A β -lactamases, a broadly diverse family of enzymes, **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 1, p. 29-57, 2016.

PIDWILL, Grace R,; GIBSON, Josie F,; COLE, Joby; RENSHAW, Stephen A,; FOSTER, Simon J. The role of macrophages in *Staphylococcus aureus* infection, **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 620339, 2021.

PIEWNGAM, Pipat; OTTO, Michael. Probiotics to prevent *Staphylococcus aureus* disease?, **Gut Microbes**, v. 11, n. 1, p. 94-101, 2020.

PIO-CORREA, Manoel. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura Brasília: IBDF, 1969,

PONGCHAIKUL, Pisut; MONGKOLSUK, Paninee. Comprehensive analysis of imipenemase (IMP)-type metallo- β -lactamase: a global distribution threatening asia, **Antibiotics**, v. 11, n, 2, p. 236, 2022.

RAHMAN. Mashihur; KHAN, Md Khurshid Alam. In silico based unraveling of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1) inhibitors from natural compounds: a molecular docking and molecular dynamics simulation study, **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2020.

RAMAMOORTHY, Anuradha et al. Differential quantification of CYP2D6 gene copy number by four different quantitative real-time PCR assays, **Pharmacogenetics and genomics**, v. 20, n, 7, p. 451, 2010.

RAMOS, Alexander, et al. Revisiting previously investigated plants: a molecular networking-based study of *Geissospermum laeve*, **Journal of natural products**, v. 80, n, 4, p. 1007-1014, 2017.

RAPOPORT, Henry, et al. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*, **Organic and Biological Chemistry**, v. 80, p. 1601- 1604, 1958.

RAPOPORT, Henry; MOORE, Richard C. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*, Isolation and Structure Determinations of Velloimine, Velloiminol, and Geissosimine, **Organic and Biological Chemistry**, v. 27, p. 2981- 2985 1962.

Reflora, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Disponível em:

<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do#CondicaoTaxonCP>, Acesso em 25 fev, 2024.

REINA, M, et al, Indole alkaloids from *Geissospermum reticulatum*, **Journal of Natural Products**, v, 75, n, 5, p, 928-934, 2012.

ROCA, Ignasi et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention, **New microbes and new infections**, v. 6, p. 22-29, 2015.

SABBAGH, Parisa et al. Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens, **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 24, n, 2, p, 136, 2021.

SAIKIA, Surovi; BORDOLOI, Manobjyoti. Molecular docking: challenges, advances and its use in drug discovery perspective, **Current drug targets**, v. 20, n, 5, p, 501-521, 2019.

SAMAHA-KFOURY, Joumana N.; ARAJ, George F. Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases, *Bmj*, v. 327, n, 7425, p. 1209-1213, 2003.

SANTOS, Camila Costa dos; VOLPATO, Rosana Sarmiento. **Toxicidade aguda oral e atividade antimalárica in vivo do extrato etanólico das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (Apocynaceae)**, 2015, 54f, Monografia (Graduação em Ciências Farmacêuticas) –Universidade Federal do Pará, Instituto Ciências da Saúde, Belém, 2015.

SARAIVA, Rosa Maria Correa et al. Antibacterial activity of medicinal plants against multidrug-resistant bacteria, **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n, 12, p. 4841, 2012.

SAUVAGE, Eric; KERFF, Frédéric; TERRAK, Mohammed; AYALA, Juan A.;

CHARLIER, Paulette. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n, 2, ., 234–258, mar, 2008.

SAWER, I, K, et al. The effect of cryptolepine on the morphology and survival of *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, **Journal of Applied Microbiology**, v. 79, n, 3, p. 314-321, 1995.

SCOTT, Alastair Ian. Biosynthesis of the indole alkaloids, **Accounts of Chemical Research**, v. 3, n, 5, p, 151-157, 1970.

SEIXAS, André F, et al. Bacterial response to oxidative stress and RNA oxidation, **Frontiers in Genetics**, v, 12, p. 821535, 2022.

SHARMA, Satish et al, Microbial biofilm: a review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment, **Microorganisms**, v. 11, n, 6, p. 1614, 2023.

SHEN, Gang et al. Design and synthesis of substrate and intermediate analogue inhibitors of S-ribosylhomocysteinase, **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n, 10, p. 3003-3011, 2006.

SILVA, Flávia Cristina. **Desenvolvimento de modelos de QSAR para identificação de substratos e inibidores de CYP3A4**, 2015, 90f, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

SILVA, João Victor da Silva e. **Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e atividade antileishmania de espécies *Geissospermum* (Apocynaceae)**, 2016, 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2016.

SILVA, Joao Victor et al. Flavopereirine—an alkaloid derived from *Geissospermum vellosii*—presents leishmanicidal activity in vitro. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 785, 2019.

SINGH, Thokchom P,; SINGH, Okram Mukherjee. Recent progress in biological activities of indole and indole alkaloids, **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 18, n, 1, p. 9-25, 2018.

SINGH, Satendra et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics analysis of drug candidates. In: **Bioinformatics**. Academic Press, 2022. p. 305-316.

SOLANO, Cristina; ECHEVERZ, Maite; LASA, Iñigo. Biofilm dispersion and quorum sensing, **Current opinion in microbiology**, v. 18, p. 96-104, 2014.

SONG, Yongxiang et al. Chlorinated bis-indole alkaloids from deep-sea derived *Streptomyces* sp, SCSIO 11791 with antibacterial and cytotoxic activities, **The Journal of Antibiotics**, v. 73, n, 8, p. 542-547, 2020.

STALCAP, Mary Margareth. **Plantas de uso medicinal ou ritual numa feira livre no Rio de Janeiro, Brasil**, 2020, 200f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020,

STEELE, Jonathan CP et al. Indole and β -Carboline Alkaloids from *Geissospermum sericeum*, **Journal of natural products**, v. 65, n, 1, p. 85-88, 2002.

STIELOW, Marlena et al. The bioavailability of drugs—the current state of knowledge, **Molecules**, v. 28, n, 24, p. 8038, 2023.

SUCHARITHA, P, et al. Absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity

assessment of drugs using computational tools, In: Computational approaches for novel therapeutic and diagnostic designing to mitigate SARS-CoV-2 infection, Academic Press, 2022, p. 335-355.

SUCHARITHA, P, et al. Absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity assessment of drugs using computational tools, In: **Computational approaches for novel therapeutic and diagnostic designing to mitigate SARS-CoV-2 infection**, Academic Press, 2022, p. 335-355.

SULAIMAN, Helmi; ROBERTS, Jason A.; ABDUL-AZIZ, Mohd H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics in critically ill patients, **Farmacia Hospitalaria**, v. 46, n, 3, p. 182-190, 2022.

SWEILEH, Waleed M. Global research publications on irrational use of antimicrobials: call for more research to contain antimicrobial resistance, **Globalization and Health**, v. 17, n, 1, p. 1-12, 2021.

TABASSUM, Riaz et al. In Silico Method for the Screening of Phytochemicals against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*, **BioMed Research International**, v. 2023, n, 1, p. 5100400, 2023.

TAESOTIKUL, Tawat et al, Hippocratic screening of ethanolic extracts from two *Tabernaemontana* species, **Journal of ethnopharmacology**, v. 27, n, 1-2, p. 99-106, 1989.

TAMMA, Pranita D, et al. Infectious Diseases Society of America guidance on the treatment of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacterales (ESBL-E), carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance (DTR-P, aeruginosa), **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n, 7, p. e169-e183, 2021.

TAN, Li et al Therapeutic targeting of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) system, **Frontiers in microbiology**, v. 9, p, 55, 2018.

TAN, Min-Jia et al. Antitussive indole alkaloids from *Kopsia hainanensis*, **Planta medica**, p. 939-944, 2010.

TAVARES, Juliana de Abreu Werner. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato bruto, das frações e dos compostos obtidos de *Geissospermum vellosii***, 2008, 78f. Dissertação (Mestrado em Neurofarmacologia e Imunofarmacologiano Programa de Pós Graduação em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008,

TELLO, Maitane et al. Characterization of a carbapenem-resistant *Escherichia coli* from dairy cattle harbouring bla NDM-1 in an IncC plasmid, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n, 3, p. 843-845, 2022.

TERADA, Yuko et al. Activation and inhibition of thermosensitive TRP channels by voacangine, an alkaloid present in *Voacanga africana*, an African tree, **Journal of Natural Products**, v. 77, n, 2, p. 285-297, 2014.

THABIT, Abrar K.; CRANDON, Jared L.; NICOLAU, David P. Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials, **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n, 2, p. 159-177, 2015.

THAKUR, Vaibhav; UNİYAL, Ankit; TIWARI, Vinod. A comprehensive review on pharmacology of efflux pumps and their inhibitors in antibiotic resistance, **European**

Journal of Pharmacology, v. 903, p. 174151, 2021.

THAPA, Anisha et al. Detection of NDM Variants (bla NDM-1, bla NDM-2, bla NDM-3) from Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: First Report from Nepal, **Infection and Drug Resistance**, p. 4419-4434, 2022.

TILAHUN, Mihret et al. Emerging carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infection, its epidemiology and novel treatment options: a review, **Infection and drug resistance**, p. 4363-4374, 2021.

TORNIMBENE, Barbara et al. WHO global antimicrobial resistance surveillance system early implementation 2016–17, **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 241-242, 2018.

Tropicos, Missouri Botanical Garden, Disponível em: <<https://www.tropicos.org/name/Search?name=Apocynaceae>>, Acesso em: 18 fev, 2024.

UDDIN, Tanvir Mahtab et al, Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects, **Journal of infection and public health**, v. 14, n. 12, p. 1750-1766, 2021.

URBAN-CHMIEL, Renata et al, Antibiotic resistance in bacteria—A review, **Antibiotics**, v. 11, n. 8, p. 1079, 2022.

URUÉN, Cristina et al. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance, **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 3, 2020.

VAN MIERT, Sabine et al. In vitro inhibition of β -haematin formation, DNA interactions, antiparasitic activity, and cytotoxicity of synthetic neocryptolepine derivatives, **Experimental parasitology**, v. 108, n. 3-4, p. 163-168, 2004.

VEBER, Daniel F, et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

VIROLLE, Chloé et al. Plasmid transfer by conjugation in Gram-negative bacteria: from the cellular to the community level, **Genes**, v. 11, n. 11, p. 1239, 2020.

VITAL, Marcos José Salgado et al. Chemical composition, ethnopharmacology and biological activity of *Geissospermum Allemão* species (Apocynaceae Juss.), **Revista Fitos**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 137-146, jan, 2015.

VOMHOF-DEKREY, Emilie E.; PICKLO SR, Matthew J. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 10, p. 1201-1206, 2012.

VON WINTERSDORFF, Christian JH et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer, **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 173, 2016.

WAGNER, Hildebert; BLADT, Sabine. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**, Springer Science & Business Media, 1996.

WANG, Qian et al. Genomic insights into the evolution and mechanisms of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* co-harboring bla KPC and bla NDM: implications for public health threat mitigation, **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 23, n. 1, p. 27, 2024.

WANG, Xiao-Jing et al. Five new fawcettimine-related alkaloids from *Lycopodium*

japonicum Thunb, **Fitoterapia**, v. 91, p. 74-81, 2013.

WATERS, Kristin. Pharmacologic similarities and differences among hallucinogens, **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 61, p. S100-S113, 2021.

WEISBERG, Alexandra J.; CHANG, Jeff H, Mobile genetic element flexibility as an underlying principle to bacterial evolution, **Annual Review of Microbiology**, v. 77, p. 603-624, 2023.

WENKERT, Ernest; KILZER, J. A Flavopereirine Synthesis¹, **The Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 2283-2284, 1962.

WERK, Anneke Nina; CASCORBI, Ingolf, Functional gene variants of CYP3A4, **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 3, p. 340-348, 2014.

WERNER, Juliana de Abreu Tavares et al. Evidence for a role of 5-HT_{1A} receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*, **Journal of ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 163-169, 2009.

WHO, World Health Organization. **Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**, Geneva: World Health Organization, 2024, Disponível em: <https://vigiram.org.br/wp-content/uploads/2024/12/OMS_2024.pdf>, Acesso em: 9 jan, 2025.

WILHARM, Gottfried et al. A simple and rapid method of bacterial transformation, **Journal of microbiological methods**, v. 80, n. 2, p. 215-216, 2010.

WU, Wenjing et al. NDM metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings, **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 10,1128/cmr, 00115-18, 2019.

WU, Yuanbo; CHEN, Meiqiao; JIANG, Jielong. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and drug targets via apoptotic signaling. **Mitochondrion**, v. 49, p. 35-45, 2019.

XIA, Guoqing; KOHLER, Thomas; PESCHEL, Andreas, The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*, **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300. n. 2-3, p. 148-154, 2010.

YANG, Yiwen et al, Profiles of bacteria/phage-comediated ARGs in pig farm wastewater treatment plants in China: Association with mobile genetic elements, bacterial communities and environmental factors, **Journal of Hazardous Materials**, v. 404, p. 124149, 2021.

YAO, Xin-gang et al, Natural product vindoline stimulates insulin secretion and efficiently ameliorates glucose homeostasis in diabetic murine models, **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 285-297, 2013.

YAZDANIAN, Mehran; GLYNN, Susan; WRIGHT, James; HAWI, Amale. Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. **Pharmaceutical research**, v. 15, n. 9, p. 1490, 1998.

YEE, Shiyin. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. **Pharmaceutical research**, v. 14, p. 763-766, 1997.

YOON, Eun-Jeong; JEONG, Seok Hoon. Class D β -lactamases, **Journal of**

Antimicrobial Chemotherapy, v. 76, n, 4, p. 836-864, 2021.

YU, Jun; CHEN, Qi. The plant extract of *Pao pereira* potentiates carboplatin effects against ovarian cancer, **Pharmaceutical Biology**, v, 52, n, 1, p, 36-43, 2014,

ZAIMA, Kazumasa et al. Vasorelaxant activity of indole alkaloids from *Tabernaemontana dichotoma*, **Journal of natural medicines**, v. 67, p. 9-16, 2013.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C.; VERNET, T. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n, 2, p. 361–385, mar, 2008.

ZHANG, Changfeng et al. Berberine at sub-inhibitory concentration inhibits biofilm dispersal in *Staphylococcus aureus*, **Microbiology**, v. 168, n, 9, p. 001243, 2022.

ZHANG, Tian C.; BISHOP, Paul L. Structure, activity and composition of biofilms, **Water Science and Technology**, v. 29, n, 7, p. 335-344, 1994.

ZHAO, Liping et al. Novel berberine derivatives as adjuvants in the battle against *Acinetobacter baumannii*: A promising strategy for combating multi-drug resistance. **Chinese Chemical Letters**, v. 35, n. 10, p. 109506, 2024.

ZHOU, Li-Na et al, Antibacterial steroidal alkaloids from *Holarrhena antidysenterica*, **Chinese journal of natural medicines**, v. 15, n, 7, p. 540-545, 2017.

ZHUANG, Mei et al. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment, **Environmental pollution**, v. 285, p. 117402, 2021.

ZIELIŃSKA, Sylwia et al. The activity of isoquinoline alkaloids and extracts from *Chelidonium majus* against pathogenic bacteria and *Candida* sp, **Toxins**, v. 11, n, 7, p. 406, 2019.

ZOU, Huiyun et al. Emergence of blaNDM-1, blaNDM-5, blaKPC-2 and blaIMP-4 carrying plasmids in *Raoultella* spp, in the environment, **Environmental Pollution**, v. 306, p. 119437, 2022.