UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

HENRIQUE BECK BIEHL

OLEORRESINA DE *Copaifera officinalis* FRENTE A *Enterococcus faecalis*: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, SINERGISMO E ANÁLISE DE BIOFILMES EM CEPAS SENSÍVEIS E RESISTENTES À VANCOMICINA

Porto Alegre
2026

CIP - Catalogação na Publicação

Biehl, Henrique Beck
OLEORRESINA DE Copaifera officinalis FRENTE A Enterococcus faecalis: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, SINERGISMO E ANÁLISE DE BIOFILMES EM CEPAS SENSÍVEIS E RESISTENTES À VANCOMICINA / Henrique Beck Biehl. -- 2026.
112 f.
Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2026.

1. Enterococcus faecalis. 2. Oleorresina de copaíba. 3. Resistência antimicrobiana. 4. Vancomicina. 5. Uma Só Saúde. I. Frazzon, Ana Paula Guedes, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo autor.

Henrique Beck Biehl

OLEORRESINA DE *Copaifera officinalis* FRENTE A *Enterococcus faecalis*: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, SINERGISMO E ANÁLISE DE BIOFILMES EM CEPAS SENSÍVEIS E RESISTENTES À VANCOMICINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Profª. Drª. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre
2026

"O bálsamo é celebrado com razão por seu excelente odor, e muito maior efeito para curar feridas, e outros diversos remédios para enfermidades, que nele se experimentam…".

Padre José Acosta (1539 - 1604)

AGRADECIMENTOS

Não há outra maneira de iniciar esta breve sessão sem registrar meu maior apreço à minha amada companheira e amor da minha vida, Yurika Biehl, sem a qual eu não teria tido o apoio e incentivo para entrar e permanecer no mestrado, a despeito dos inúmeros desafios pelos quais passamos neste período. Junto a ela, soma-se minha gratidão pelos três bens mais preciosos de nossas vidas, nossos filhos Myuki, Heitor e Otto, que sacrificaram a companhia do pai em tantos momentos para que ele perseguisse seus objetivos. Destaco, também, minha profunda gratidão aos meus pais, Cleoton Biehl e Maria Celeste Biehl, por seu empenho durante toda vida, para que os filhos obtivessem não apenas uma educação escolar de qualidade, mas sim educação no seu sentido mais amplo e profundo.

À minha orientadora, Ana Paula Guedes Frazzon, exprimo a minha mais sincera e profunda gratidão. Sua compreensão, paciência, presença e parceria foram indispensáveis pelo meu bem-estar e ânimo durante os anos do mestrado, nos quais dividi minhas energias com tantas funções distintas da vida. Professora Ana é a personificação do termo “orientador”: não é alguém que dita as regras que os subalternos devem seguir, muito menos é omissa; muito pelo contrário, ela é daquelas “mãezonas” que conduz e acompanha o crescimento de seus pupilos e se alegra por suas conquistas. Sempre encontra disposição para sentar-se, ouvir, avaliar e consolar. Não há como sair de uma experiência de receber sua orientação sem ser uma pessoa melhor e mais elevada.

Junto à professora Ana, estendo minha gratidão à sua colega de laboratório, professora Fátima Menezes Bento, e a todos os colegas que passaram pelo laboratório 536 do ICBS com quem convivi. Agradeço pelos conselhos, materiais compartilhados, pelas caronas nas autoclavagens, e sobretudo, pelo espírito de parceria que cada um fez acontecer. Também agradeço às técnicas e corpo administrativo do ICBS e PPGMAA pela eficiência, disponibilidade e auxílio.

A meus colegas-irmãos, do Centro de Microscopia e Microanálise, Chris, Francis, Denise, Ronei, Rodolfo (realocado para outro setor neste meio tempo, mas um grande amigo) e Susan, expresso minha gratidão por terem segurado as pontas por tantas vezes que tive que sair mais cedo ou me ausentar do CMM, por sua parceria e por tornarem o CMM um lugar tão agradável e acolhedor. Também agradeço o imenso incentivo à qualificação que os atuais diretores e ex-diretores do CMM, Paulo Fichter, Fabiano Bernardi, Fátima Guma, Daniel Baptista e Naira Balzaretti ofereceram aos técnicos do CMM.

Agradeço ao professor Geraldo Luiz Gonçalves Soares pela disponibilidade e assistência referente às lacunas de pesquisa da oleorresina de copaíba, que foi o pontapé inicial para que este trabalho acontecesse. Também agradeço à professora Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma pelo apoio que sempre me deu como técnico e para este trabalho, doando corantes para avaliação inicial na microscopia. Ao professor Ricardo Abreu da Rosa e ao doutorando Leonardo Jahnke pela bondade de cederem amostras dentárias bovinas para enriquecer a minha pesquisa, que, apesar de não ter conseguido utilizar neste trabalho, poderão ser utilizadas futuramente.

Por fim, agradeço à UFRGS, ICBS, Departamento de Microbiologia e CMM pela estrutura, pessoal e equipamentos que permitiram a realização desta pesquisa e da minha formação.

OLEORRESINA DE *Copaifera officinalis* FRENTE A *Enterococcus faecalis*: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, SINERGISMO E ANÁLISE DE BIOFILMES EM CEPAS SENSÍVEIS E RESISTENTES À VANCOMICINA[1]

Autor: Henrique Beck Biehl

Orientadora: Profª. Drª. Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

A crescente disseminação da resistência antimicrobiana tem comprometido significativamente a eficácia terapêutica no tratamento de infecções bacterianas, incluindo as associadas a enterococos resistentes à vancomicina. Diante desse cenário, a prospecção de produtos naturais como fontes de novos agentes antimicrobianos torna-se uma estratégia promissora. Assim, o presente estudo avaliou a atividade da oleorresina de *Copaifera officinalis* (copaíba) frente a cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* sensíveis (VSE) e resistentes à vancomicina (VRE), bem como sua capacidade de modular a ação de antibióticos convencionais e interferir na formação de biofilmes. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de difusão em disco frente a bactérias Gram-positivas, incluindo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29231, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, bem como frente a bactérias Gram-negativas, incluindo *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* INCQS 0031. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da oleorresina de copaíba por microdiluição em caldo, a avaliação do efeito bactericida por subcultivo, as interações entre a oleorresina e antibióticos convencionais por dupla difusão em disco e a inibição da formação de biofilmes por microscopia confocal de varredura a laser foram realizados em cepas sensíveis e resistentes à vancomicina (VSE e VRE). A análise de biofilmes incluiu coloração com fluoresceína diacetato (FDA) e iodeto de propídio (IP), sendo a viabilidade celular estimada pela razão IP/FDA. Os resultados do presente estudo demonstraram que a oleorresina de copaíba apresentou atividade frente a bactérias Gram-positivas, não sendo observada atividade contra bactérias Gram-negativas. A CIM foi de 1,25% (v/v) e 2,5% (v/v) para as cepas VSE e VRE, respectivamente. O subcultivo indicou efeito bacteriostático. A dupla difusão em disco demonstrou predominância de antagonismo entre a oleorresina e os antibióticos avaliados para VSE e VRE. A análise por microscopia confocal evidenciou atividade dose-dependente da oleorresina em biofilmes de *E. faecalis*, com maior efeito em isolados VSE. Conclui-se que a oleorresina de *C. officinalis* apresenta atividade antimicrobiana e antibiofilme frente a *E. faecalis*, inclusive VRE, embora com menor intensidade nos isolados resistentes.

[1]Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Junho 2026.

Copaifera officinalis OLEORESIN AGAINST *Enterococcus faecalis*: ANTIMICROBIAL ACTIVITY, SYNERGISM AND BIOFILM ANALYSIS IN VANCOMYCIN-SUSCEPTIBLE AND VANCOMYCIN-RESISTANT STRAINS[1]

Author: Henrique Beck Biehl

Advisor: Prof. Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

The increasing spread of antimicrobial resistance has significantly compromised the therapeutic efficacy of treatments for bacterial infections, including those associated with vancomycin-resistant enterococci. Due to this situation, the exploration of natural products as sources of new antimicrobial agents has emerged as a promising strategy. Accordingly, the present study evaluated the activity of the oleoresin from *Copaifera officinalis* (copaiba) against clinical strains of vancomycin-susceptible *(VSE)* and vancomycin-resistant (VRE) E*nterococcus faecalis*, as well as its ability to modulate the activity of conventional antibiotics and interfere with biofilm formation. Antibacterial activity was assessed using the disk diffusion method against Gram-positive bacteria, including *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29231, *Bacillus cereus* ATCC 14579, and *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, as well as Gram-negative bacteria, including *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Escherichia coli* INCQS 0031. The minimum inhibitory concentration (MIC) of copaiba oleoresin was determined by broth microdilution, bactericidal activity was evaluated by subculture assays, interactions between the oleoresin and conventional antibiotics were investigated using the double disk diffusion method, and biofilm inhibition was analyzed by confocal laser scanning microscopy in vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant strains. Biofilm analysis included staining with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI), and cell viability was estimated based on the PI/FDA ratio. The results demonstrated that copaiba oleoresin exhibited antibacterial activity against Gram-positive bacteria, whereas no activity was observed against Gram-negative bacteria. MIC values were 1.25% (v/v) and 2.5% (v/v) for the VSE and VRE strains, respectively. Subculture assays indicated a bacteriostatic effect. Double disk diffusion assays revealed a predominance of antagonistic interactions between the oleoresin and the antibiotics tested against both VSE and VRE strains. Confocal microscopy analysis showed a dose-dependent effect of the oleoresin on *E. faecalis* biofilms, with greater activity observed in VSE isolates. In conclusion, *C. officinalis* oleoresin exhibits antimicrobial and antibiofilm activity against *E. faecalis*, including VRE strains, although its effects are less pronounced in resistant isolates.

[1]Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. June, 2026

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
2 OBJETIVOS 4
2.1 Objetivo Geral 4
2.2 Objetivos Específicos 4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5
3.1 Resistência antimicrobiana como problema global de saúde pública e seu impacto na medicina moderna 5
3.1.1 Resistência antimicrobiana e Uma Só Saúde 6
3.1.2 Desafios para a produção de novos antibióticos 9
3.2 Relevância de *Enterococcus* spp. no cenário de resistência antimicrobiana e limitação terapêutica 10
3.2.1 Biologia do gênero *Enterococcus* 10
3.2.2 Mecanismos específicos de resistência a antibióticos em *Enterococcus* 12
3.2.3 Epidemiologia de *Enterococcus* VRE 18
3.3 Novos horizontes no combate às bactérias RAM 20
3.4 Oleorresinas 21
3.4.1 Composição química das oleorresinas 23
3.4.2 Atividade antimicrobiana das oleorresinas 23
3.4.3 Diterpenos de oleorresinas como inibidores de bombas de efluxo 24
3.4.4 Desafios técnicos no trabalho com oleorresinas 26
3.5 O gênero *Copaifera* L. e a espécie *Copaifera officinalis* 26
3.5.1 Biologia do gênero *Copaifera* e *Copaifera officinalis* 27
3.5.2 Oleorresinas de copaíba: distinções químicas entre espécies e seus perfis antimicrobianos 28
3.6 Atividade de *Copaifera officinalis* frente a *Enterococcus*: lacunas e perspectivas 30
4 METODOLOGIA 32
4.1 Oleorresina de *Copaifera officinalis* 32
4.2 Cepas empregadas nos ensaios e condições de cultivo 32
4.2.1 Cepas E. faecalis sensíveis e resistentes à vancomicina 33
4.3 Ensaio de atividade antibacteriana da oleorresina de *C. officinalis* por difusão em disco 35
4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 35
4.5 Avaliação qualitativa do efeito bactericida 36
4.6 Teste de sinergismo e antagonismo com antibióticos 37
4.7 Avaliação da integridade da membrana bacteriana por microscopia confocal de varredura a laser 38

4.7.1 Formação do biofilme 38
4.7.2 Tratamento com oleorresina 39
4.7.3 Marcação por dupla fluorescência e aquisição das imagens 41
4.7.4 Análise quantitativa das imagens por microscopia confocal 42
5 RESULTADOS 46
5.1 Caracterização química da oleorresina de *Copaifera officinalis* 46
5.2 Origem clínica e identificação das cepas por MALDI-TOF 47
5.3 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana 47
5.4 Atividade antibacteriana da oleorresina de *Copaifera officinalis* por difusão em disco 49
5.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 52
5.5.1 Controle do solvente (DMSO) 52
5.5.2 Avaliação qualitativa do efeito bactericida 53
5.6 Avaliação do sinergismo e antagonismo entre a oleorresina de *Copaifera officinalis* e antibióticos convencionais 54
5.7 Avaliação da integridade da membrana bacteriana por microscopía confocal de varredura a laser 58
5.7.1 Validação dos controles experimentais 58
5.7.2 Efeito da oleorresina de copaíba sobre a integridade de membrana nos biofilmes de *E. faecalis* 61
5.7.3 Análise comparativa entre isolados VSE e VRE 65
6 DISCUSSÃO 68
6.1 Composição química da oleorresina de *Copaifera officinalis* 68
6.2 Validação das cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* VSE/VRE 69
6.3 Espectro antibacteriano da oleorresina frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas 72
6.4 Atividade inibitória, controle do DMSO e efeito bacteriostático da oleorresina 74
6.5 Interações entre oleorresina e antibióticos convencionais 76
6.6 Avaliação da integridade da membrana bacteriana por microscopia confocal de varredura a laser 77
7 CONCLUSÃO 82
8 REFERÊNCIAS 83

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Relação cepa-origem clínica das amostras utilizadas no estudo. 33

Tabela 2. Composição dos tratamentos controle e com a CIM da oleorresina..... 40

Tabela 3. Métricas de fluorescência calculadas por canal em cada imagem confocal, com definição e interpretação biológica..... 43

Tabela 4. Resultado da identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF (*Microflex LT*, *Bruker Daltonics*, Bremen, Alemanha) dos isolados de *Enterococcus faecalis* incluídos no estudo..... 47

Tabela 5. Diâmetros médios dos halos de inibição (mm) obtidos pelo método de difusão em disco para os isolados VSE e VRE de *Enterococcus faecalis*, com classificação de susceptibilidade conforme CLSI M100 (33ª ed., 2023). Os valores correspondem à média dos ensaios realizados em triplicata. 49

Tabela 6. Avaliação qualitativa da atividade antibacteriana da oleorresina de *C. officinalis* pelo método de difusão em disco frente a espécies Gram-positivas e Gram-negativas. Os valores correspondem à média dos ensaios realizados em triplicata independente. “Ausente” indica ausência de halo de inibição. 50

Tabela 7. Concentração inibitória mínima (CIM) da oleorresina de *C. officinalis* para os isolados VSE e VRE de *E. faecalis*, determinada por microdiluição em MHC. Os valores correspondem à média dos ensaios realizados em triplicata. 52

Tabela 8. Classificação das interações entre oleorresina de *C. officinalis* e antibióticos nos isolados VSE 55

Tabela 9. Classificação das interações entre oleorresina de *C. officinalis* e antibióticos nos isolados VRE 56

Tabela 10. Razão IP/FDA e redução de biomassa viável nas cepas VSE e VRE submetidas ao tratamento com CIM e 2× CIM da oleorresina de copaíba. 62

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Seleção e disseminação de bactérias resistentes após o uso de antibióticos. A exposição ao antimicrobiano elimina bactérias sensíveis, enquanto células resistentes sobrevivem, multiplicam-se e podem transferir determinantes de resistência a outros microrganismos. **Fonte:** Adaptado de CDC (2013). 7

Figura 2. Representação dos principais mecanismos pelos quais bactérias desenvolvem resistência aos antibióticos. **Fonte:** Adaptado de CDC (2019). 8

Figura 3. Disseminação da resistência antimicrobiana sob a perspectiva Uma Só Saúde. **Fonte:** Adaptado de CDC (2013). 9

Figura 4.. Aspectos macroscópicos e microscópicos de Enterococcus faecalis **(A)** Colônias de E. faecalis em ágar TSB. **(B)** Enterococcus faecalis em coloração de Gram. **(C)** Microscopia de varredura de E. faecalis – colorido digitalmente. **Fonte: (A)** Acervo do autor. **(B)** Sahay (2013) **(C)** Robert Koch Institute (2023).....11

Figura 5. Mecanismo de ação da vancomicina em bactérias sensíveis e mecanismo de resistência de alto nível em enterococos. **(1)** Em bactérias sensíveis, os precursores do peptidoglicano apresentam terminação D-Ala-D-Ala e são incorporados à parede pela ação das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). **(2)** Na presença de vancomicina, o antibiótico liga-se ao D-Ala-D-Ala e impede a ação das PBPs, bloqueando a transpeptidação e a transglicosilação. **(3)** Em bactérias resistentes (genótipo vanA), o operon vanHAX substitui o dipeptídeo terminal por D-Ala-D-Lac, ao qual a vancomicina liga-se com afinidade aproximadamente mil vezes menor. **(4)** Com a vancomicina afastada do alvo, as PBPs catalisam a reticulação por pentaglicina, mantendo a integridade da parede celular. MurNAc-GlcNAc: cadeia alternada de N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina. **Fonte:** Adaptado de Li et al. (2023). 15

Figura 6. Etapas do desenvolvimento do biofilme em *Enterococcus* spp. Células planctônicas aderem à superfície por fatores de adesão, formam microcolônias e evoluem para biofilme maduro envolto por matriz extracelular. A matriz contém eDNA, polissacarídeos, LTA e proteínas associadas à adesão, maturação e organização estrutural do biofilme. **Fonte:** Adaptado de Ch'ng et al. (2019). 17

Figura 7. Aspectos morfológicos de espécies do gênero Copaifera. (A) Vista do fuste de um indivíduo do gênero *Copaifera* L. em ambiente de floresta tropical, evidenciando o porte arbóreo elevado, a casca com textura rugosa e a ramificação característica da copa. (**B)** Tronco e copa de *Copaifera officinalis*, com destaque para a coloração esbranquiçada da casca externa e a

arquitetura ramificada típica da espécie em condições de maior luminosidade. **Fonte: (A)** Lira-Guedes (2020a). **(B)** Santiago et al. (2021). 28

Figura 8. Etapas de obtenção da oleorresina de copaíba e produto comercial. (**A**) Operação de perfuração do tronco com trator motorizado. **(B)** Coleta da oleorresina. (**C)** Oleorresina bruta. (**D)** Versão comercializada da oleorresina de copaíba em frasco com conta-gotas, ilustrando a forma de acondicionamento tipicamente adotada para comercialização. **Fonte: (A)** Lira-Guedes (2020b) **(B)** Lira-Guedes (2019) **(C)** Rocha (2017) **(D)** Plumerya® Óleos Essenciais, s.d. 29

Figura 9. Placa de cultivo celular com fundo de lamínula. Esta placa permite a visualização de células aderidas na superfície do vidro, que possui espessura de 0,17 mm, permitindo observação por microscópio confocal invertido. 39

Figura 10. Placa pronta para aquisição das imagens por microscopia confocal. 41

Figura 11. Certificado de análise cromatográfica (CG-FID) da oleorresina de *Copaifera officinalis*, lote 010 (Plumerya® Óleos Essenciais). À esquerda, informações de identificação botânica e método de extração. Ao centro, cromatograma com os picos numerados. À direita, tabela de composição química da fração volátil e assinatura da responsável técnica. **Fonte:** Plumerya® Óleos Essenciais.....46

Figura 12. Registro fotográfico representativo do ensaio qualitativo de difusão em disco da oleorresina de *Copaifera officinalis* frente às espécies Gram-positivas. Observa-se formação de halo de inibição em **(A)** *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; **(B)** *Bacillus cereus* ATCC 14579; **(C)** *Staphylococcus aureus* ATCC 29231; e **(D)** *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. 51

Figura 13. Registro fotográfico representativo do ensaio qualitativo de difusão em disco da oleorresina de *C. officinalis* frente às espécies Gram-negativas. Observa-se ausência de halo de inibição em **(E)** *Salmonella* spp.; **(F)** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; e **(G)** *Escherichia coli* INCQS 0031. 51

Figura 14. Cultura representativa do controle de solvente após 24h de incubação em MHA. Observa-se crescimento bacteriano confluente na presença de DMSO na máxima concentração utilizada para VRE (2,5%), confirmando ausência de atividade antimicrobiana do solvente nas condições experimentais empregadas. 53

Figura 15. Cultura represntativa dos VSE após ensaio de CIM. Observa-se crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas (5% a 0,15%), além do controle positivo (C+). O controle negativo (C−) não apresentou crescimento, confirmando a esterilidade do meio. Os resultados são sugestivos de ausência de efeito bactericida nas condições avaliadas. 54

Figura 16. Cultura representativa dos VRE após ensaio de CIM. Observa-se crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas (5% a 0,15%), além do controle positivo (C+). O controle negativo (C−) não apresentou crescimento, confirmando a esterilidade do meio. Os resultados são sugestivos de efeito predominantemente bacteriostático da oleorresina nas condições avaliadas..... 54

Figura 17. Representação dos resultados do teste de sinergismo e antagonismo por difusão em disco da oleorresina de copaíba e de antibióticos convencionais frente a cepas de *E. faecalis* VSE e VRE. Os painéis A–C correspondem à cepa 586 (VSE). Em **(A)**, observa-se ausência de halo de inibição ao redor do disco de papel impregnado com a concentração inibitória mínima (CIM) da oleorresina. Em **(B)**, observa-se ausência de halo ao redor do disco contendo a CIM da oleorresina, enquanto o disco de cloranfenicol (CLO 30) apresenta halo de inibição. Em **(C)**, observa-se ausência de halo ao redor do disco contendo a CIM da oleorresina e presença de halo de inibição ao redor do disco de vancomicina (VAN 30). Os painéis D–F correspondem à cepa 2074 (VRE). Em **(D)**, observa-se ausência de halo de inibição ao redor do disco impregnado com a CIM da oleorresina. Em **(E)**, observa-se ausência de halo ao redor do disco contendo a CIM da oleorresina e presença de halo de inibição ao redor do disco de estreptomicina (EST), antibiótico ao qual a cepa se mostrou sensível. Em **(F)**, observa-se ausência de halo tanto ao redor do disco contendo a CIM da oleorresina quanto ao redor do disco de vancomicina (VAN 30), compatível com o perfil resistente da cepa VRE. 57

Figura 18. Imagens representativas de microscopia confocal de varredura a laser dos grupos controle. **(verde):** fluorescência FDA, indicativa de células metabolicamente ativas. **(vermelho):** fluorescência IP, indicativa de células com membrana comprometida. **(A)** C−: sinal verde ausente e vermelho intenso, confirmando morte total por etanol. **(B)** C+ VSE, **(C)** C+ VRE: sinal verde predominante, confirmando biofilme viável. **(D)** Controle de DMSO CIM VSE, **(E)** Controle de DMSO CIM VRE, **(F)** Controle de DMSO 2× CIM VSE e **(G)** Controle de DMSO 2× CIM VRE: sinal verde mantido, confirmando que o solvente não compromete a viabilidade. Aquisição: microscópio confocal Olympus FV1000, objetiva UPLSAPO 60× S (NA 1,30); lasers 473 nm (FDA) e 559 nm (IP); primeiros 20 cortes do eixo Z. 60

Figura 19. Imagens representativas das cepas VSE **(A)** 485, **(B)** 586, **(C)** 633 e **(D)** 1220 submetidos ao tratamento com a CIM e com o dobro dessa concentração (2× CIM) da oleorresina de copaíba. Em cada isolado, a identificação **.1** indica a imagem referente ao tratamento com CIM, enquanto a identificação **.2** indica a imagem referente ao tratamento com 2× CIM. As imagens confocais foram obtidas com marcação por FDA (verde) e iodeto de propídio – IP (vermelho). 63

Figura 20. Imagens representativas das cepas VRE **(A)** 1854, **(B)** 1950, **(C)** 2074 e **(D)** 2390

submetidos ao tratamento com a CIM e com o dobro dessa concentração (2× CIM) da oleorresina de copaíba. Em cada isolado, a identificação **.1** indica a imagem referente ao tratamento com CIM, enquanto a identificação **.2** indica a imagem referente ao tratamento com 2× CIM. As imagens confocais foram obtidas com marcação por FDA (verde) e iodeto de propídio – IP (vermelho). 64

Figura 21. Análise comparativa da razão IP/FDA na CIM e na 2× CIM entre todas as cepas VSE e VRE. Barras em tons de verde: cepas VSE; barras em tons de roxo: cepas VRE. Tons claros: CIM; tons escuros: 2× CIM. Linha tracejada vermelha: limiar de inversão (razão = 1,0). Valores acima da linha indicam morte celular predominante na análise de fluorescência. 66

Figura 22. Reconstruções tridimensionais representativas de biofilmes de *Enterococcus faecalis* marcados com diacetato de fluoresceína (FDA; verde) e iodeto de propídio (IP; vermelho), obtidas por microscopia confocal de varredura a laser. O FDA indica células metabolicamente ativas com membrana preservada, enquanto o IP indica células com membrana comprometida. **(A)** C−, controle de morte por etanol, com fluorescência vermelha predominante. **(B)** C+ VSE e **(C)** C+ VRE, controles não tratados, com predomínio de fluorescência verde. **(D–G)** Controles DMSO nas concentrações equivalentes à CIM e 2× CIM para VSE e VRE, com manutenção do sinal verde, indicando ausência de efeito relevante do solvente sobre a viabilidade celular. **(H)** CIM VSE e **(I)** CIM VRE apresentam padrão misto, com aumento do sinal vermelho e persistência de áreas verdes, sugerindo dano de membrana parcial e manutenção de subpopulações viáveis. **(J)** 2× CIM VSE e **(K)** 2× CIM VRE exibem predomínio de sinal vermelho, compatível com maior comprometimento de membrana, embora ainda haja focos residuais de fluorescência verde, especialmente em VRE. As imagens são representativas de um isolado de cada grupo e condição de tratamento.**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

α – Alfa

β – Beta

δ – Delta

% – Porcentagem

> – Maior que

< – Menor que

≥ – Maior ou igual a

± – Mais ou menos; usado para média ± desvio padrão

× – Multiplicação; usado para indicar múltiplos da CIM

− – Sinal de menos; usado em controles negativos e reduções percentuais

↑ – Aumento ou inversão da razão IP/FDA

† – Símbolo de nota ou observação específica

∑ – Somatório

µ/μ – Micro; prefixo do Sistema Internacional

µg/μg – Micrograma

µg/mL/μg/mL – Micrograma por mililitro

µL – Microlitro

mL – Mililitro

mm – Milímetro

nm – Nanômetro

h – Hora

min – Minuto

pH – Potencial hidrogeniônico

v/v – Volume por volume

C – Átomo de carbono

C_{10} – Compostos com dez átomos de carbono

C_{15} – Compostos com quinze átomos de carbono

C_{20} – Compostos com vinte átomos de carbono

2× CIM – Duas vezes a concentração inibitória mínima

4× CIM – Quatro vezes a concentração inibitória mínima

Agg – Substância de agregação

Ant – Antagonista

ASCENSION – Estudo multicêntrico brasileiro ASCENSION

AtlA – Autolisina AtlA

BHIA – Ágar Infusão de Cérebro e Coração ou *Brain Heart Infusion agar*

BHIB – Caldo Infusão de Cérebro e Coração ou *Brain Heart Infusion broth*

C+ – Controle positivo

C−/C- – Controle negativo

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CC17 – Complexo clonal 17

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CG-EM/CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CG-FID – Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama

Ch0 – Canal 0 de fluorescência

Ch1 – Canal 1 de fluorescência

CIM – Concentração Inibitória Mínima ou *Minimum Inhibitory Concentration*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMEB/MBEC – Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme ou *Minimum Biofilm Eradication Concentration*

COVID-19 – Doença causada pelo coronavírus de 2019

cylA – Gene associado à citolisina

D-Ala – D-alanina

D-Ala-D-Ala – D-alanil-D-alanina

D-Ala-D-Lac – D-alanil-D-lactato

D-Lac – D-lactato

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

Ebp – Pili associados à endocardite e ao biofilme

eDNA – DNA extracelular

Epa – Antígeno polissacarídico enterocócico

Esp/*esp* – Proteína ou gene de superfície enterocócica

ESKAPE – Grupo de patógenos formado por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.

FDA – *Food and Drug Administration*; no ensaio confocal, diacetato de fluoresceína

FDA/IP – Marcação dupla por diacetato de fluoresceína e iodeto de propídio

FIC – Concentração Inibitória Fracionária

FICI – Índice de Concentração Inibitória Fracionária

Fsr – Sistema de *quorum sensing* fsr

FV1000 – Microscópio confocal modelo FluoView 1000 (Olympus, Japão)

GelE/*gelE* – Gelatinase e gene da gelatinase

GlcNAc – N-acetilglucosamina

IP – Iodeto de propídio

IP/FDA – Razão entre a fluorescência do iodeto de propídio e do diacetato de fluoresceína

Jacq. – Abreviatura de Jacquin, autoridade botânica

L. – Abreviatura de Linnaeus, autoridade botânica

LTA – Ácido lipoteicóico ou *lipoteichoic acid*

MALDI-TOF – *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*

MCVL – Microscopia Confocal de Varredura a Laser

MDR – Multirresistente ou *Multidrug-resistant*

MFS – *Major Facilitator Superfamily*

MHA – Ágar Mueller-Hinton

MHA-CA – Ágar Mueller-Hinton cátion ajustado

MHB – Caldo Mueller-Hinton ou *Mueller-Hinton Broth*

MHC – Caldo Mueller-Hinton

MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MurNAc – N-acetilmurâmico

NA – Abertura numérica ou *numerical aperture*

NaCl – Cloreto de sódio

Neu – Neutro

NHSN – *National Healthcare Safety Network*

NorA – Bomba de efluxo NorA

OMS – Organização Mundial da Saúde

parc. – Parcial

PBP – Proteína ligadora de penicilina

PBP4 – Proteína ligadora de penicilina 4

PBP5 – Proteína ligadora de penicilina 5

PBPs – Proteínas ligadoras de penicilina

PBS – *Phosphate-buffered saline* ou solução salina tamponada com fosfato

PI – *Propidium iodide* ou iodeto de propídio

PRISMA – *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*

RAM – Resistência antimicrobiana

Red. – Redução

Sin – Sinérgico

SprE – Serina-protease SprE

ST1133 – *Sequence type* 1133

SW-10 – Software FluoView SW-10 (Olympus, Japão)

THG – Transferência Horizontal de Genes

TIFF – *Tagged Image File Format*

Tn1546 – Transposon Tn1546

TSA – Ágar Triptona de Soja ou *Tryptic Soy Agar*

UA – Unidades arbitrárias

UFC – Unidades formadoras de colônia

UFC/mL – Unidades formadoras de colônia por mililitro

UHPLC-EM/EM – Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem

UHPLC-MS/MS – *Ultra-High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*

UPLSAPO – Modelo de lente objetiva do microscópio confocal (Olympus, Japão)

van – Conjunto de genes ou *operons* associados à resistência aos glicopeptídeos

vanA – Genótipo de resistência à vancomicina associado a alta resistência

vanB – Genótipo de resistência à vancomicina com susceptibilidade variável à teicoplanina

vanC – Genótipo intrínseco de resistência à vancomicina em *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus*

vanD/vanE/vanG – Variantes menos prevalentes de genótipos *van*

vanH – Gene associado à produção de D-lactato no *operon van*

vanHAX – *Operon* formado por *vanH*, *vanA* e *vanX*

VanA – Ligase alternativa D-Ala-D-Lac

VanH – Enzima que reduz piruvato a D-lactato

VanR – Regulador de resposta do sistema VanS-VanR

VanS – Histidina-quinase sensor de vancomicina

VanS-VanR – Sistema regulatório de dois componentes associado ao *operon vanHAX*

VanX – Enzima que hidrolisa dipeptídeos D-Ala-D-Ala

VRE – *Enterococcus* resistente à vancomicina ou *Vancomycin-resistant Enterococci*

VSE – *Enterococcus* sensível à vancomicina ou *Vancomycin-susceptible Enterococci*

Y – Eixo vertical indicado nas reconstruções confocais

Z – Eixo de profundidade nas imagens confocais

Z-*stack* – Pilha de imagens adquiridas ao longo do eixo Z

1 INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos transformou radicalmente a prática médica do século XX, tornando viáveis procedimentos como cirurgias complexas, transplantes de órgãos e terapias imunossupressoras (Ventola, 2015). No entanto, o uso excessivo e inadequado desses fármacos na medicina humana, veterinária e na agropecuária, gerou pressão seletiva contínua sobre as populações bacterianas, acelerando a emergência e a disseminação de microrganismos resistentes (Prestinaci et al., 2015; Davies et al., 2010).

A resistência antimicrobiana (RAM) é hoje reconhecida como uma das principais ameaças globais à saúde pública: em 2019, foi associada a cerca de 4,95 milhões de mortes em todo o mundo (Murray et al., 2022), e estimativas consolidadas projetam até 10 milhões de óbitos anuais e perdas econômicas superiores a 100 trilhões de dólares até 2050, caso medidas efetivas de contenção não sejam adotadas (O'Neill, 2016; GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2024).

Os mecanismos de resistência bacteriana são variados e frequentemente atuam de forma combinada, incluindo a modificação ou proteção do alvo do fármaco, a diminuição da permeabilidade da membrana celular, a superexpressão de sistemas de efluxo e a inativação enzimática dos antibióticos (Munita et al., 2016). A aquisição de genes que codificam estes mecanismos ocorre por transferência horizontal de genes, incluindo conjugação, transformação e transdução (Davies et al., 2010; Munita et al., 2016). Além dessas vias, vesículas extracelulares têm sido descritas como veículos de transferência de determinantes de resistência em *Enterococcus* spp. (Domingues; Nielsen, 2017; Lehmkuhl et al., 2024). Esses mecanismos contribuem para a disseminação acelerada dos determinantes de resistência entre espécies e ambientes distintos, expandindo o impacto da resistência antimicrobiana para além do ambiente hospitalar. Essa dinâmica está alinhada ao conceito de Uma Só Saúde (*One Health*), que reconhece a interdependência entre a saúde humana, animal e ambiental na emergência e disseminação da resistência antimicrobiana (Prestinaci et al., 2015).

Entre os patógenos associados à resistência antimicrobiana, o gênero *Enterococcus* ocupa posição de destaque devido à sua elevada relevância clínica. Esses cocos Gram-positivos, integrantes da microbiota intestinal, são representados principalmente por *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, espécies responsáveis por mais de 90% das infecções enterocócicas, como infecções urinárias,

bacteremia, endocardite e infecções de feridas cirúrgicas (Garcia-Solache et al., 2019; Fiore et al., 2019). A importância clínica desse grupo é ampliada pela sua elevada capacidade de aquisição de resistência antimicrobiana, em especial à vancomicina. Essa resistência emerge pela aquisição do operon *van*, responsável por modificar a biossíntese do peptidoglicano e reduzir significativamente a afinidade do antibiótico por seu alvo (Zeng et al., 2016; Miller et al., 2014). No Brasil, o estudo multicêntrico ASCENSION (2022–2023) evidenciou que mais de 90% dos isolados invasivos de *E. faecium* associados à assistência à saúde são resistentes à vancomicina (Antochevis et al., 2025), sendo também descritos isolados de *E. faecalis* portadores do genótipo *vanA* em contextos de surtos hospitalares.

Ao mesmo tempo em que a resistência antimicrobiana se expande em múltiplos ambientes e hospedeiros, a inovação no desenvolvimento de novos antibióticos avança em ritmo insuficiente para acompanhar essa ameaça (WHO, 2025; Melchiorri et al., 2024). Diante do esgotamento do arsenal antibiótico convencional, ganham espaço estratégias *beyond antibiotics,* nas quais se destaca a exploração de produtos naturais como potenciais fontes de moléculas bioativas (Yarahmadi et al., 2025). Entre os compostos de origem vegetal investigados, a copaíba (*Copaifera officinalis* Jacq. L.) destaca-se pela relevância farmacológica de sua oleorresina, exsudato obtido por perfuração dos canais secretores axiais localizados no cerne do tronco (Rodrigues et al., 2009; Pieri et al., 2009). Trata-se de uma matriz bifásica constituída por fração volátil rica em sesquiterpenos, com predominância de *β*-cariofileno, e por fração não volátil composta por diterpenos ácidos, incluindo ácido copálico, ácido caurenoico e ácido hardwíckico (da Trindade et al., 2018; Arruda et al., 2019).

Essa composição, distinta dos óleos essenciais obtidos por destilação, confere à oleorresina bruta um perfil farmacológico mais amplo, com atividade antimicrobiana documentada frente a bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Enterococcus faecalis* (Santos et al., 2008; Vieira et al., 2018). Seu mecanismo de ação, baseado principalmente na desestabilização da membrana citoplasmática bacteriana, é independente dos alvos moleculares sobre os quais atua a vancomicina (Pfeifer Barbosa et al., 2019), o que sustenta a hipótese de que a oleorresina possa ser ativa mesmo contra isolados de enterococos resistentes à vancomicina (VRE).

A crescente necessidade de novas alternativas terapêuticas para o controle

de VRE, associada ao interesse científico emergente pelo gênero *Copaifera*, evidencia uma lacuna relevante na literatura. Até o presente momento, não foram encontrados estudos que avaliem a atividade da oleorresina de *Copaifera officinalis* frente a isolados de *E. faecalis* com resistência à vancomicina. A identificação dessa lacuna decorreu de levantamento bibliográfico de caráter narrativo, conduzido nas bases PubMed, Scopus, Web of Science, SciELO e Google Acadêmico, mediante combinações dos descritores "*Copaifera*", "oleorresina", "*Enterococcus* faecalis", "vancomycin-resistant *Enterococcus*", "atividade antimicrobiana", "biofilme" e "sinergismo", em português e em inglês, priorizando-se artigos originais e revisões que associassem produtos naturais à atividade antimicrobiana frente a enterococos. Tal lacuna fundamenta a justificativa do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o potencial antimicrobiano da oleorresina de *C. officinalis* frente a isolados sensíveis e resistentes à vancomicina de *E. faecalis*, visando contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas complementares no contexto da resistência antimicrobiana.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a atividade antimicrobiana da oleorresina de *Copaifera officinalis* frente a cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da oleorresina de *C. officinalis* frente a isolados clínicos de *E. faecalis* sensíveis e resistentes à vancomicina;
- Determinar a concentração inibitória mínima da oleorresina de *C. officinalis* para isolados clínicos de *E. faecalis* sensíveis e resistentes à vancomicina;
- Analisar possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos da oleorresina de *C. officinalis* em associação com antibióticos de uso comercial frente a isolados clínicos de *E. Faecalis* sensíveis e resistentes à vancomicina;
- Verificar por microscopia confocal a integridade da membrana bacteriana e a estrutura do biofilme em isolados clínicos sensíveis e resistentes à vancomicina de *E. faecalis*, após pela exposição à oleorresina de *C. officinalis*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Resistência antimicrobiana como problema global de saúde pública e seu impacto na medicina moderna

Até a primeira metade do século XX, infecções bacterianas frequentemente representavam um prognóstico fatal. Esse cenário começou a se modificar com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming e sua introdução como o primeiro antibiótico de uso terapêutico em larga escala, inaugurando uma nova era na medicina moderna (O'Neill, 2016; Fleming, 1945). A utilização dos antibióticos revolucionou o tratamento de doenças infecciosas, reduzindo drasticamente a mortalidade associada a infecções bacterianas e tornando viáveis procedimentos até então considerados de alto risco, como cirurgias complexas, transplantes de órgãos e terapias imunossupressoras (Ventola, 2015). No entanto, já em seu discurso do Prêmio Nobel de 1945, Fleming alertava que o uso inadequado e doses subterapêuticas de antibióticos poderiam selecionar microrganismos resistentes, previsão que, baseada em evidências experimentais à época, antecipou com precisão a crise que se consolidaria nas décadas seguintes (Fleming, 1945; Davies et al., 2010).

Passadas mais de sete décadas desse alerta, numerosos antibióticos foram desenvolvidos e importantes mecanismos moleculares de resistência antimicrobiana (RAM) foram elucidados (Davies et al., 2010; Munita et al., 2016). Contudo, paralelamente ao avanço terapêutico, observou-se também a expansão contínua de microrganismos multirresistentes em ambientes clínicos, comunitários, veterinários e ambientais (Murray et al., 2022; Prestinaci et al., 2015). Atualmente, a resistência antimicrobiana é reconhecida como uma das principais ameaças globais à saúde pública, comprometendo a eficácia de tratamentos convencionais e elevando significativamente as taxas de morbidade, mortalidade e custos hospitalares (Murray et al., 2022; Prestinaci et al., 2015; WHO, 2020).

A resistência antimicrobiana emergiu, assim, como uma das mais sérias crises de saúde pública da atualidade, cuja progressão poderá ser comparável em escala ao impacto das mudanças climáticas e da pandemia de COVID-19 (GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2024). Em 2019, infecções bacterianas resistentes a antimicrobianos foram associadas a aproximadamente 4,95 milhões de mortes em todo o mundo, sendo 1,27 milhão diretamente atribuídas à RAM, tornando-

a uma das principais causas de mortalidade global (GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2024). Análises recentes projetam que infecções por bactérias resistentes a antimicrobianos poderão ser responsáveis por mais de 39 milhões de mortes entre 2025 e 2050 (Kariuki, 2024).

Este fenômeno ameaça inviabilizar procedimentos essenciais da medicina moderna, como quimioterapia, transplantes de órgãos e cirurgias complexas, que dependem de antibióticos eficazes para prevenir infecções fatais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizou em 2024 sua lista de patógenos bacterianos prioritários, reconhecendo que a pandemia de RAM continua a provocar uma crise global, especialmente em países de baixa e média renda (Millar et al., 2026).

3.1.1 Resistência antimicrobiana e Uma Só Saúde

A resistência antimicrobiana é definida como a capacidade de microrganismos sobreviverem e multiplicarem-se mesmo na presença de fármacos que anteriormente eram eficazes para eliminá-los ou inibir seu crescimento. Do ponto de vista clínico-microbiológico, é fundamental distinguir três modalidades: (i) a resistência intrínseca, característica natural de uma espécie independente de exposição prévia ao fármaco; (ii) a resistência adquirida, resultante de mutações cromossômicas ou incorporação de material genético exógeno; e (iii) a resistência adaptativa, fenômeno induzível e geralmente reversível, desencadeado por estímulos ambientais específicos, como concentrações subinibitórias do antibiótico e biofilmes (Munita et al., 2016; Van Schaik et al., 2024).

Embora a resistência seja um processo biológico natural, decorrente de seleção natural e mutações espontâneas que precede em muito a era antibiótica, sua aceleração nas últimas décadas é resultado direto do uso excessivo e inadequado de antibióticos na medicina humana, veterinária e na agricultura (Prestinaci et al., 2015; GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2024). O princípio evolutivo subjacente é a pressão seletiva: ao expor uma população bacteriana a um antimicrobiano, sobretudo em concentrações subinibitórias, as células sensíveis são eliminadas, enquanto as variantes portadoras de determinantes de resistência sobrevivem e tornam-se predominantes (Davies et al., 2010; Prestinaci et al., 2015) (Figura 1).

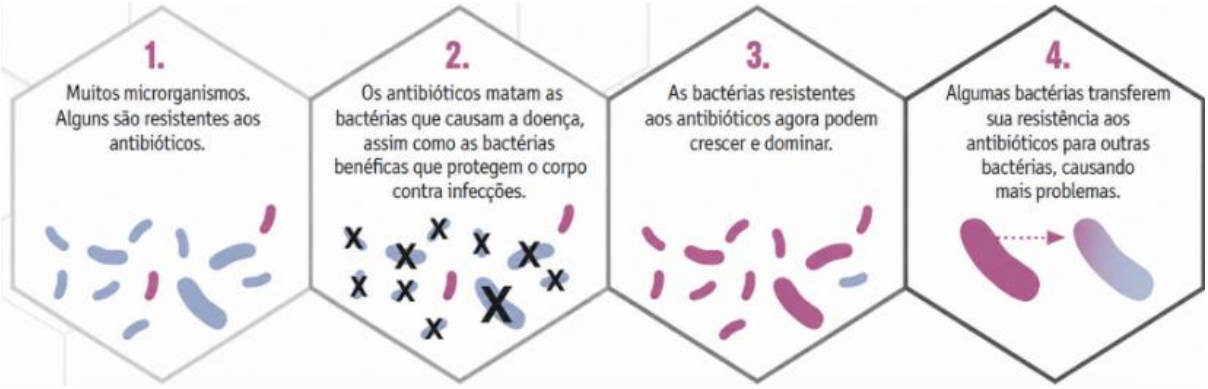


Figura 1. Seleção e disseminação de bactérias resistentes após o uso de antibióticos. A exposição ao antimicrobiano elimina bactérias sensíveis, enquanto células resistentes sobrevivem, multiplicam-se e podem transferir determinantes de resistência a outros microrganismos. **Fonte:** Adaptado de CDC (2013).

Os determinantes de resistência podem ser adquiridos por mutações cromossômicas ou por transferência horizontal de Genes (THG), sendo esta última o principal mecanismo de disseminação rápida entre populações e espécies distintas. A THG ocorre por conjugação, transformação e transdução, mediadas por elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons (Davies et al., 2010; Munita et al., 2016). Além dos mecanismos clássicos de THG, vesículas extracelulares têm sido descritas como uma via adicional de transferência de determinantes de resistência, capazes de carrear material genético e outros efetores entre células bacterianas sem depender do contato direto exigido pela conjugação, tendo sido documentadas inclusive em *Enterococcus* spp. (Domingues; Nielsen, 2017; Lehmkuhl et al., 2024).

Em nível bioquímico, há três mecanismos de resistência antimicrobiana que são particularmente relevantes para a compreensão do presente trabalho: (i) a modificação ou proteção do sítio-alvo, como a remodelação dos precursores da parede celular que dá origem à resistência aos glicopeptídeos, representa o mecanismo central da resistência à vancomicina em enterococos*;* (ii) a redução da permeabilidade de membrana limita a entrada do antibiótico na célula e é um dos fatores que explicam a menor suscetibilidade de bactérias Gram-negativas a compostos lipofílicos e (iii) a superexpressão de bombas de efluxo remove ativamente o fármaco do citoplasma antes que ele atinja concentração efetiva no seu alvo (Munita

et al., 2016; Van Schaik et al., 2024). A inativação enzimática do fármaco, exemplificada pela produção de β- lactamases, completa o repertório de estratégias bacterianas (Figura 2).

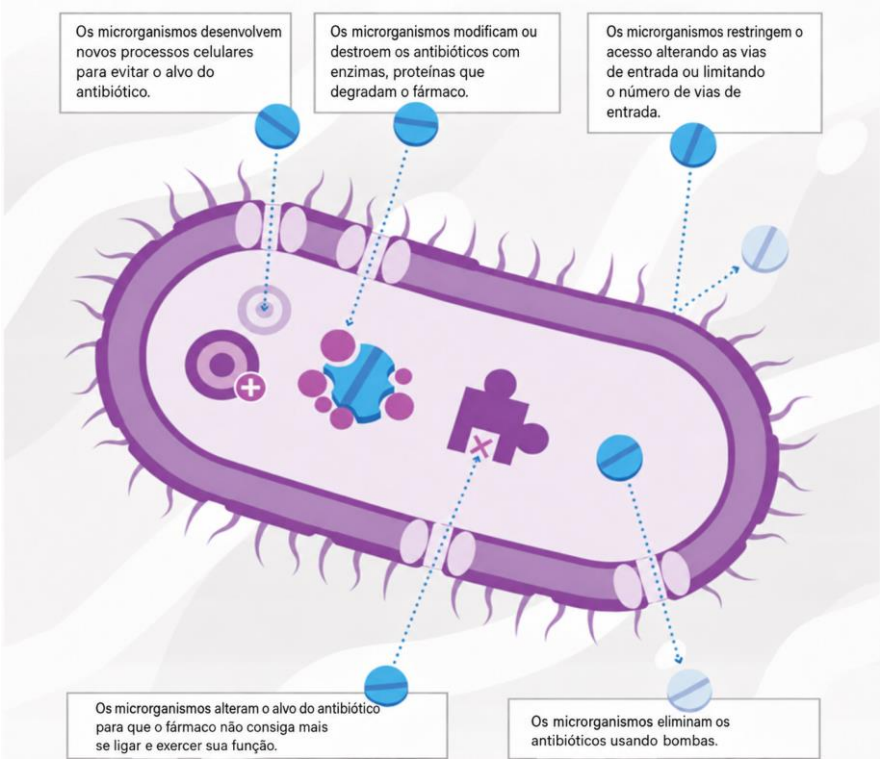


Figura 2. Representação dos principais mecanismos pelos quais bactérias desenvolvem resistência aos antibióticos. **Fonte:** Adaptado de CDC (2019).

A resistência antimicrobiana não se restringe ao ambiente clínico, configurando-se como um fenômeno multifacetado que integra as dimensões humana, animal e ambiental, conforme a perspectiva de Uma Só Saúde (*One Health*) (Figura 3). Genes de resistência presentes em animais de produção, alimentos, solo e água atuam como fontes contínuas de disseminação para a população humana (Prestinaci et al., 2015).

É ainda relevante distinguir a resistência antimicrobiana propriamente dita, de fenômenos de tolerância e persistência, como os biofilmes, nos quais subpopulações bacterianas podem sobreviver à exposição ao antibiótico sem apresentar elevação da concentração inibitória mínima, contribuindo para falhas terapêuticas e recidivas. Em síntese, a soma desses determinantes genéticos, bioquímicos e coletivos (como os biofilmes) confere às bactérias notável capacidade adaptativa, que se amplifica à medida que esses microrganismos circulam entre ambientes clínicos, veterinários e naturais, explicando a rápida obsolescência de

antimicrobianos e reforçando a urgência da busca por novas estratégias terapêuticas (Van Schaik et al., 2024; Garcia-Solache et al., 2019).

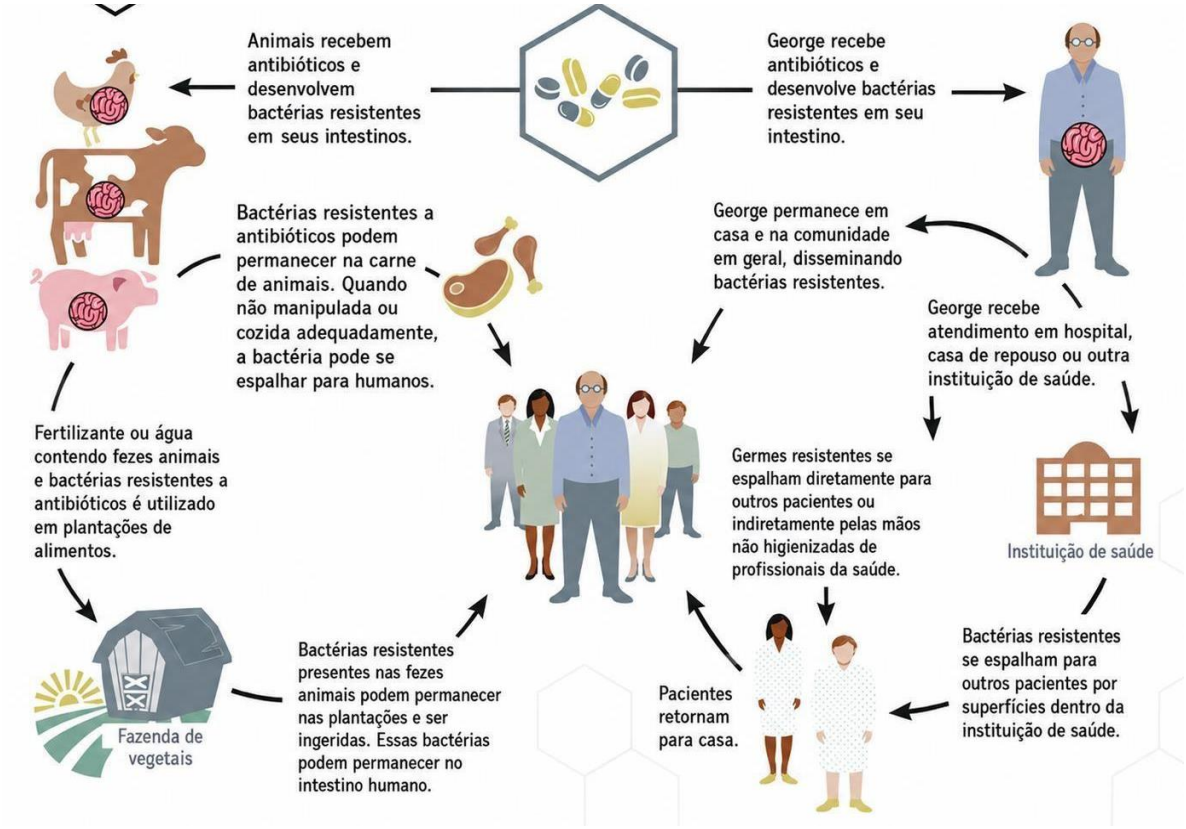


Figura 3. Disseminação da resistência antimicrobiana sob a perspectiva Uma Só Saúde. **Fonte:** Adaptado de CDC (2013).

3.1.2 Desafios para a produção de novos antibióticos

A crise humana desencadeada pela resistência antimicrobiana é agravada por um descompasso temporal: enquanto as bactérias adquirem e disseminam mecanismos de resistência com rapidez, o desenvolvimento de novos antibióticos é lento, caro e cada vez mais raro. Esse desequilíbrio está associado ao chamado "vale da morte", etapa crítica entre a pesquisa pré-clínica e o desenvolvimento clínico, em que a maioria dos candidatos é descontinuada por falta de financiamento e ausência de incentivos econômicos (Seyhan, 2019). Por uma questão de preservação da eficácia, novos antibióticos devem ser reservados apenas para casos graves, o que reduz o retorno financeiro para a indústria quando comparado a medicamentos de uso contínuo, desincentivo que levou muitas grandes empresas farmacêuticas a

abandonarem o setor (Gargate et al., 2025). Como consequência, o *pipeline* clínico atual permanece dominado por derivados de classes já existentes, com pouquíssimas moléculas verdadeiramente inovadoras capazes de combater os patógenos de prioridade crítica definidos pela OMS (WHO, 2025; Melchiorri et al., 2024). Esse esgotamento do arsenal terapêutico convencional reforça a urgência de investigar abordagens alternativas e complementares ao uso isolado de antibióticos, particularmente aquelas baseadas em produtos naturais com histórico de atividade antimicrobiana documentada.

3.2 Relevância de *Enterococcus* spp. no cenário de resistência antimicrobiana e limitação terapêutica

É nesse cenário de arsenal terapêutico em colapso e pipeline antibiótico estagnado que a emergência de patógenos multirresistentes assume dimensões particularmente críticas. Entre os microrganismos que melhor ilustram essa convergência entre resistência adquirida, virulência adaptada e limitação terapêutica, destaca-se o gênero *Enterococcus* — com uma espécie (*E. faecium*) incluída pela OMS em sua lista de patógenos prioritários de 2024 e integrante do grupo ESKAPE, conjunto de bactérias responsáveis pela maior parte das infecções hospitalares de difícil tratamento no mundo (Millar et al., 2026; Garcia-Solache et al., 2019).

3.2.1 Biologia do gênero *Enterococcus*

Os enterococos são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, tipicamente arranjados em pares ou cadeias curtas, pertencentes ao filo Bacillota e historicamente reclassificados a partir do gênero *Streptococcus*. O gênero compreende mais de 80 espécies, das quais apenas algumas integram a microbiota humana como comensais e duas, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium,* são responsáveis por mais de 90% das infecções clínicas. Habitam naturalmente o trato gastrointestinal de humanos e animais, onde atuam como comensais, integrando a microbiota intestinal sem causar dano ao hospedeiro saudável (Garcia-Solache et al., 2019). Essa relação, contudo, altera-se quando há ruptura das barreiras fisiológicas, como em cirurgias, uso de cateteres, internações prolongadas ou imunossupressão,

condição na qual espécies do gênero passam a comportar-se como patógenos oportunistas (Garcia-Solache et al., 2019; Geraldes et al., 2022).

Uma das características mais marcantes do gênero é sua notável resiliência ambiental. Os enterococos são capazes de sobreviver em condições adversas, como amplas faixas de temperatura (10°C a 45°C), concentrações elevadas de sal (6,5% NaCl) e pH alcalino (Geraldes et al., 2022). Estas características permitem a persistência prolongada dessas bactérias em superfícies inertes, equipamentos e ambientes hospitalares, favorecendo a transmissão cruzada entre pacientes e a manutenção de reservatórios destes microsganismos em unidades de saúde (Geraldes et al., 2022).

Embora frequentemente tratadas em conjunto, *E. faecalis* (figura 4) e *E. faecium* não apresentam o mesmo desfecho clínico. Historicamente, *E. faecalis* é responsável pela maior parte das infecções enterocócicas, ao passo que *E. faecium*, embora menos frequente, concentra os fenótipos de multirresistência mais preocupantes, sobretudo a resistência à vancomicina (Garcia-Solache et al., 2019; Geraldes et al., 2022). Em conjunto, ambas as espécies figuram entre as principais causas de infecções hospitalares, com destaque para quadros como infecções do trato urinário, endocardite, bacteremia e infecções de feridas cirúrgicas, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Garcia-Solache et al., 2019; Geraldes et al., 2022).

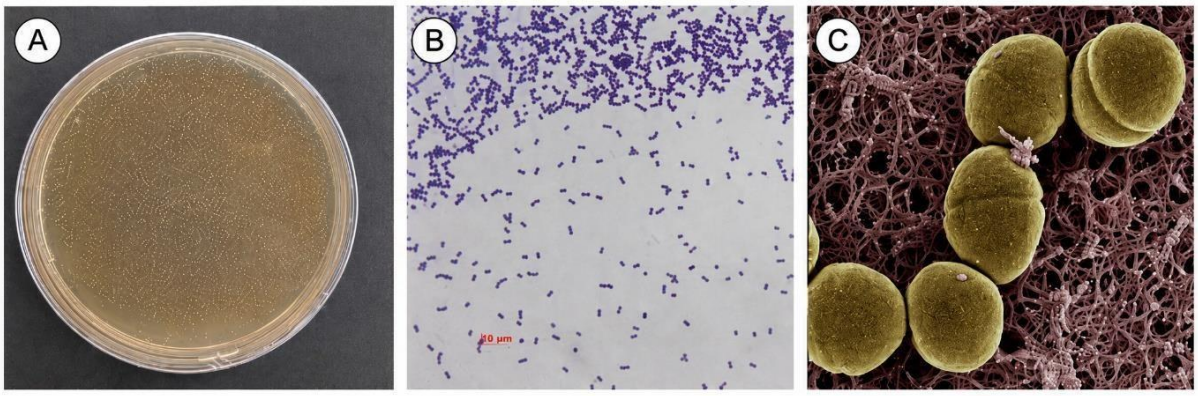


Figura 4.. Aspectos macroscópicos e microscópicos de *Enterococcus faecalis* **(A)** Colônias de *E. faecalis* em ágar TSB. **(B)** Enterococcus faecalis em coloração de Gram. **(C)** Microscopia de varredura de *E. faecalis* – colorido digitalmente. **Fonte: (A)** Acervo do autor. **(B)** Sahay (2013) **(C)** Robert Koch

A patogenicidade dos enterococos é mediada por um conjunto diversificado de fatores de virulência. Destaca-se a capacidade de formar biofilmes, comunidades

bacterianas estruturadas e aderidas a superfícies bióticas e abióticas, incluindo dispositivos médicos como cateteres e válvulas cardíacas. O biofilme funciona como uma barreira física e fisiológica que dificulta a penetração de antimicrobianos e protege as células da resposta imune do hospedeiro, sendo um dos principais determinantes da cronicidade e da recidiva das infecções enterocócicas (Geraldes et al., 2022; Sadanandan et al., 2025). A esse mecanismo somam-se outros fatores, como a produção de gelatinase (codificada pelo gene *gelE*), uma enzima que degrada tecidos do hospedeiro; a citolisina (*cylA*), com atividade hemolítica e citotóxica; e a proteína de superfície *esp*, que favorece a adesão e a colonização (Geraldes et al., 2022; Sadanandan et al., 2025). Além do arsenal de virulência, *E. faecalis* apresenta marcante capacidade de adquirir e transferir genes de resistência por meio de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e ilhas de patogenicidade, característica que, combinada à resiliência ambiental e aos fatores de virulência já descritos, ajuda a explicar por que esse gênero se tornou um problema clínico de difícil controle (Van Schaik et al., 2024; Geraldes et al., 2022).

3.2.2 Mecanismos específicos de resistência a antibióticos em *Enterococcus*

Aplicando ao caso específico do gênero *Enterococcus,* além dos mecanismos de resistência descritos anteriormente, observa-se uma combinação particularmente desafiadora de resistência intrínseca e adquirida, que limita de forma acentuada as opções terapêuticas disponíveis (Van Schaik et al., 2024; Geraldes et al., 2022). É essa sobreposição de mecanismos naturais e adquiridos que explica por que infecções enterocócicas, tornaram-se um problema clínico relevante.

A resistência intrínseca corresponde a características inerentes ao gênero, independentes de exposição prévia aos fármacos. Os enterococos são naturalmente resistentes a cefalosporinas, sulfonamidas e a baixos níveis de aminoglicosídeos. A baixa suscetibilidade aos β-lactâmicos decorre da expressão de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) de baixa afinidade, como a PBP4 em *E. faecalis* e a PBP5 em *E. faecium*, que continuam a sintetizar a parede celular mesmo na presença do antibiótico (Van Schaik et al., 2024). A resistência intrínseca de baixo nível aos aminoglicosídeos, por sua vez, tem consequência clínica decisiva: como a parede celular do enterococo é pouco permeável a esses fármacos, eles são pouco eficazes quando administrados isoladamente. Por esse motivo, o tratamento de infecções

graves historicamente recorre à associação de um aminoglicosídeo com um agente que atua na parede celular, como um β- lactâmico ou um glicopeptídeo, combinação que produz efeito bactericida sinérgico. Quando a bactéria adquire resistência de alto nível a esse parceiro terapêutico, esse sinergismo é perdido, estreitando drasticamente o arsenal disponível (Van Schaik et al., 2024; Geraldes et al., 2022).

A resistência adquirida, por outro lado, é favorecida pela elevada plasticidade genômica do gênero, que incorpora com facilidade determinantes de resistência por meio dos elementos genéticos móveis já descritos. Nos enterococos, esses mecanismos incluem a modificação do alvo ribossomal e a ação de enzimas modificadoras, responsáveis pela resistência a macrolídeos e a aminoglicosídeos em alto nível, alterações em alvos que conferem resistência a fluoroquinolonas e, de forma clinicamente crítica, a remodelação dos precursores da parede celular, que dá origem à resistência aos glicopeptídeos (Van Schaik et al., 2024; Geraldes et al., 2022). Soma-se a esse repertório a tolerância associada ao biofilme, descrita anteriormente, na qual subpopulações bacterianas sobrevivem transitoriamente à exposição aos antimicrobianos sem apresentar elevação da concentração inibitória mínima, contribuindo para falhas terapêuticas e recidivas (Sadanandan et al., 2025).

3.2.2.1 Resistência à Vancomicina e a Outros Antimicrobianos

A resistência aos glicopeptídeos representa o aspecto mais crítico do perfil de resistência enterocócica, e compreender por que a vancomicina ocupa esse papel central no tratamento exige retomar três pontos já apresentados. Primeiro, *Enterococcus* é intrinsecamente resistente a todas as cefalosporinas, o que elimina essa classe inteira de β- lactâmicos da prática clínica. Segundo, *E. faecium* desenvolveu resistência de alto nível à ampicilina, um dos poucos β-lactâmicos historicamente úteis contra o gênero, retirando essa opção em grande parte dos isolados hospitalares. Terceiro, os aminoglicosídeos, isoladamente, são pouco eficazes devido à resistência intrínseca de baixo nível e só funcionam em terapia combinada com um agente que atua na parede celular. A confluência desses três fatores fez da vancomicina o agente que melhor preenche essa lacuna terapêutica, consolidando-a como o principal antibiótico utilizado contra infecções enterocócicas multirresistentes, sobretudo em *E. faecium* (Van Schaik et al., 2024; Li et al., 2023).

A vancomicina é um antibiótico glicopeptídico isolado em 1953 por Edmund

Kornfeld (Eli Lilly) e aprovado para uso clínico pelo FDA em 1958, obtida a partir de *Streptomyces orientalis* (atualmente reclassificado como *Amycolatopsis orientalis*), e introduzido na prática clínica nas décadas seguintes como agente de reserva para infecções graves por bactérias Gram-positivas, incluindo *Enterococcus* spp. E *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (Li et al., 2023; Zeng et al., 2016). Seu mecanismo de ação é particular: a molécula liga-se com alta afinidade à terminação D-Ala-D-Ala dos precursores do peptidoglicano ancorados aos resíduos alternados de N-acetilmurâmico (MurNAc) e N-acetilglucosamina (GlcNAc), impedindo o acesso das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) que possuem atividade de transpeptidase e transglicosilase e, com isso, bloqueando a incorporação dos novos monômeros à cadeia em crescimento da parede celular (Figura 5, painéis 1 e 2) (Li et al., 2023). Como resultado, a síntese da parede é interrompida, levando à bacteriostase em enterococos (Li et al., 2023).

A resistência à vancomicina em *Enterococcus* (VRE do inglês *Vancomycin-resistant Enterococci*) surge quando a bactéria adquire um conjunto de genes *van* que reprograma a via de síntese do peptidoglicano. No genótipo *vanA*, o mais relevante clinicamente, três enzimas trabalham de forma coordenada: VanH reduz piruvato a D-lactato; VanA é uma ligase alternativa que liga D-Ala a D-Lac em vez de D-Ala- D-Ala; e VanX hidrolisa os dipeptídeos D-Ala-D-Ala residuais, evitando que precursores sensíveis à vancomicina sejam incorporados à parede. O resultado é a substituição da terminação dos precursores por D-Alanil-D-Lactato (D-Ala-D-Lac), que reduz em aproximadamente mil vezes a afinidade de ligação da vancomicina ao seu alvo (Li et al., 2023; Wei et al., 2024). Esse circuito é regulado pelo sistema de dois componentes VanS-VanR: a histidina-quinase VanS, localizada na membrana, detecta a presença da vancomicina e fosforila o regulador de resposta VanR, que ativa a transcrição do operon *vanHAX* (Zeng et al., 2016). Como as PBPs continuam a realizar a transpeptidação e a transglicosilação normalmente sobre os precursores modificados com terminação D-Ala-D-Lac (Figura 5, paineis 3 e 4), a bactéria mantém a integridade da parede celular mesmo na presença do antibiótico (Li et al., 2023).

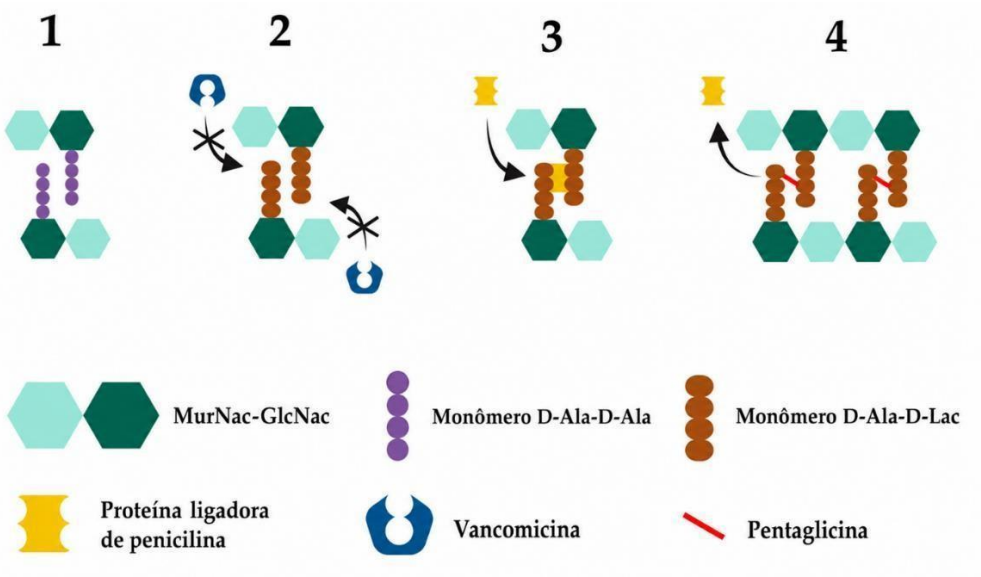


Figura 5. Mecanismo de ação da vancomicina em bactérias sensíveis e mecanismo de resistência de alto nível em enterococos. **(1)** Em bactérias sensíveis, os precursores do peptidoglicano apresentam terminação D-Ala-D-Ala e são incorporados à parede pela ação das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). **(2)** Na presença de vancomicina, o antibiótico liga-se ao D-Ala-D-Ala e impede a ação das PBPs, bloqueando a transpeptidação e a transglicosilação. **(3)** Em bactérias resistentes (genótipo vanA), o operon vanHAX substitui o dipeptídeo terminal por D-Ala-D-Lac, ao qual a vancomicina liga-se com afinidade aproximadamente mil vezes menor. **(4)** Com a vancomicina afastada do alvo, as PBPs catalisam a reticulação por pentaglicina, mantendo a integridade da parede celular. MurNAc-GlcNAc: cadeia alternada de N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina. **Fonte:** Adaptado de Li et al. (2023).

Além de *vanA*, já foram descritos outros genótipos *van,* como o *vanB*, que confere resistência apenas à vancomicina, com susceptibilidade variável à teicoplanina; *vanC*, de natureza intrínseca em *E. gallinarum e E. casseliflavus*; e variantes menos prevalentes como *vanD*, *vanE* e *vanG*, de menor relevância epidemiológica (Li et al., 2023; Wei et al., 2024). O genótipo *vanA* é particularmente preocupante por estar associado ao transposon Tn1546, elemento genético móvel capaz de ser transferido por conjugação entre cepas e mesmo entre espécies, o que sustenta a rápida disseminação horizontal da resistência em ambientes hospitalares (Li et al., 2023).

Diante da emergência dos VRE, as opções terapêuticas tornaram-se progressivamente mais escassas, e o tratamento dessas infecções passou a depender de antimicrobianos de última linha, como a linezolida (oxazolidinona que inibe a síntese proteica por ligação à subunidade 50S do ribossomo), a daptomicina (lipopeptídeo que desorganiza a membrana citoplasmática) e a tigeciclina (glicilciclina que inibe a síntese proteica) (Van Schaik et al., 2024). Contudo, isolados resistentes

a essas drogas já vêm sendo relatados em diferentes regiões do mundo, alguns deles por mecanismos que envolvem modificações ribossomais, mutações em sistemas de regulação da membrana ou bombas de efluxo, fenômenos que estreitam ainda mais o arsenal disponível e tornam o quadro epidemiológico do VRE motivo de crescente preocupação clínica (Van Schaik et al., 2024; Wei et al., 2024).

3.2.2.2 Infecção associada a biofilme por enterococos

A capacidade de formar biofilmes (Figura 6) constitui um dos principais fatores de virulência do gênero *Enterococcus* e responde por grande parte da dificuldade terapêutica imposta pelas infecções enterocócicas. Biofilmes são comunidades estruturadas de microrganismos aderidos a superfícies bióticas ou abióticas e protegidos por uma matriz extracelular composta de DNA extracelular (eDNA), polissacarídeos, proteínas e ácido lipoteicóico (LTA), que confere tolerância intrínseca aos antimicrobianos e protege as células bacterianas da resposta imune do hospedeiro (Ch'ng et al., 2019; Ruhal et al., 2024). *Enterococcus faecalis* é responsável por 25% de todas as infecções do trato urinário associadas a cateter, e infecções de feridas e endocardite por enterococos estão invariavelmente associadas à presença de biofilme (Ch'ng et al., 2019).

O desenvolvimento do biofilme enterocócico segue quatro etapas sequenciais: adesão inicial à superfície, formação de microcolônias, maturação e dispersão. Na etapa de adesão, adesinas de superfície como o pili associados a endocardite e biofilme (Ebp), a substância de agregação (Agg) e a proteína de superfície enterocócica (Esp) medeiam a ligação a fibrinogênio, colágeno e superfícies epiteliais (Ch'ng et al., 2019; Ruhal et al., 2024). A maturação do biofilme depende da produção de eDNA liberado por células metabolicamente ativas com participação da autolisina AtlA, de polissacarídeos como o antígeno polissacarídico enterocócico (Epa) e da atividade das proteases GelE e SprE, reguladas pelo sistema de *quorum sensing fsr* (Ch'ng et al., 2019; Ruhal et al., 2024).

Do ponto de vista clínico, os biofilmes enterocócicos representam um desafio terapêutico de primeira ordem por duas razões complementares. Primeiro, a tolerância aos antimicrobianos é substancialmente maior em células sésseis do que em células planctônicas: biofilmes maduros de isolados clínicos de *E. faecalis* exibem concentrações de erradicação mínima de biofilme (MBEC) de vancomicina significativamente superiores àquelas observadas em células planctônicas, e essa

tolerância aumenta progressivamente com a idade do biofilme (Ch'ng et al., 2019). Segundo, o biofilme funciona como reservatório ativo de transferência horizontal de genes de resistência, onde as condições de proximidade celular e a presença de eDNA na matriz facilitam a conjugação mediada por plasmídeos, incluindo a transferência de *vanA* de *E. faecalis* para *S. aureus* em biofilmes polimicrobianos, efeito potencializado pelos feromônios peptídicos que coordenam a agregação celular e ampliam a eficiência conjugativa (Ch'ng et al., 2019; Ruhal et al., 2024). A tolerância farmacológica e potencial de disseminação de resistência torna a formação de biofilme um atributo central na patogenicidade de *E. faecalis*.

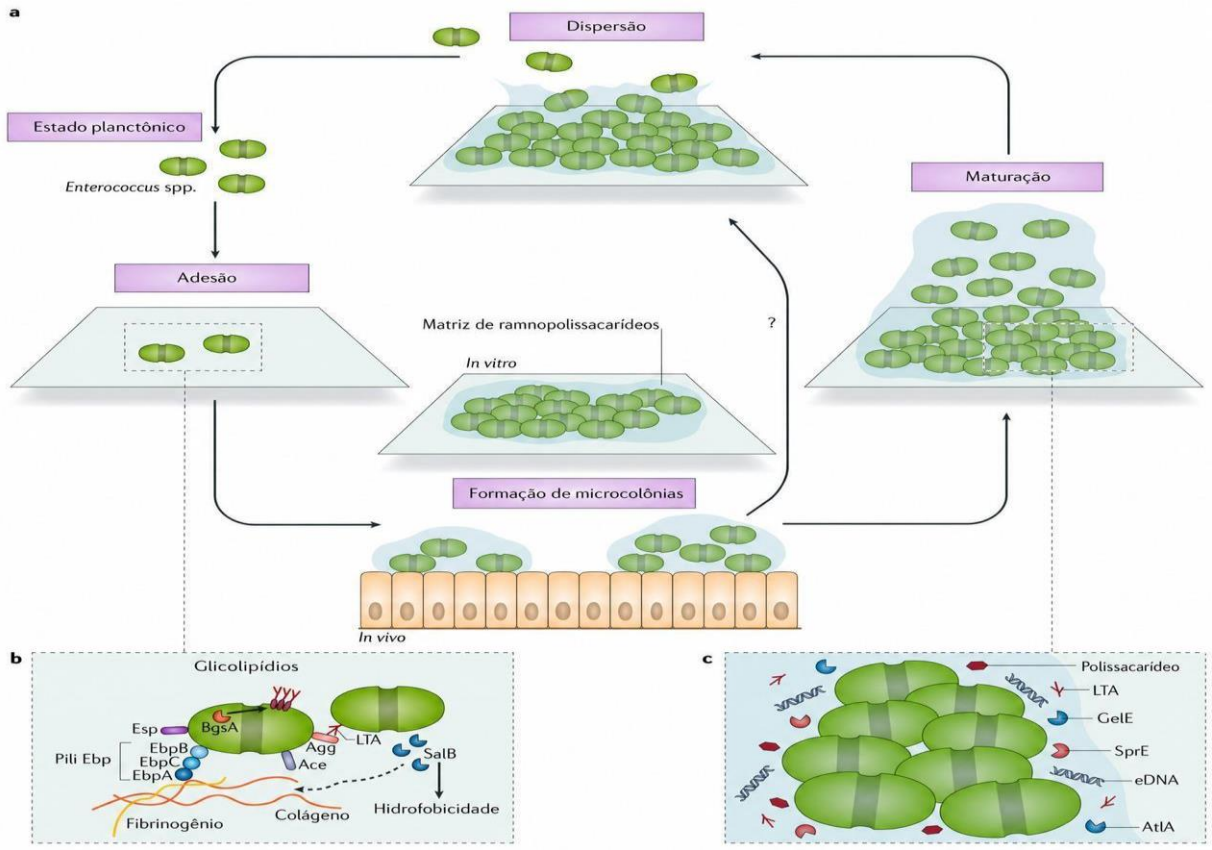


Figura 6. Etapas do desenvolvimento do biofilme em *Enterococcus* spp. Células planctônicas aderem à superfície por fatores de adesão, formam microcolônias e evoluem para biofilme maduro envolto por matriz extracelular. A matriz contém eDNA, polissacarídeos, LTA e proteínas associadas à adesão, maturação e organização estrutural do biofilme. **Fonte:** Adaptado de Ch'ng et al. (2019).

3.2.3 Epidemiologia de *Enterococcus* VRE

Apresentadas as bases biológicas e mecanísticas da resistência, cabe agora examinar como o VRE se distribui na prática clínica e quais são as dimensões do problema em escala global e nacional. Um aspecto-chave da epidemiologia do VRE é a distinção entre colonização e infecção: enterococos resistentes podem habitar o trato gastrointestinal de pacientes hospitalizados de forma assintomática, situação denominada colonização, sem configurar quadro infeccioso. Essa colonização, no entanto, atua como o principal reservatório para a transmissão cruzada e para o surgimento de infecções clínicas em pacientes vulneráveis (Li et al., 2023; CDC, 2019). Por esse motivo, programas de vigilância em unidades de risco frequentemente incluem o rastreamento de portadores assintomáticos por *swab* retal, como parte das estratégias de contenção de surtos. Compreender o panorama do VRE exige, portanto, considerar não apenas as infecções diagnosticadas, mas também a circulação silenciosa do patógeno em ambientes hospitalares.

3.2.3.1 Epidemiologia global

O primeiro isolado clínico de VRE foi descrito em 1988, na França e no Reino Unido, marcando o início de uma rápida disseminação global do patógeno nas décadas seguintes (Li et al., 2023). Um capítulo importante dessa história está diretamente ligado à perspectiva de Uma Só Saúde (*One Health)* na Europa, durante os anos 1980 e 1990, o uso do avoparcin, um análogo da vancomicina, como promotor de crescimento na pecuária criou pressão seletiva contínua em animais de produção, contribuindo para a emergência do VRE em reservatórios animais e alimentares antes mesmo de sua consolidação como problema hospitalar de larga escala (Li et al., 2023; Wei et al., 2024).

A prevalência atual de VRE varia geograficamente, mas apresenta tendências de crescimento em quase todos os continentes. Nos Estados Unidos, o CDC estima 54.500 infecções por VRE e 5.400 mortes apenas em 2017, sendo que mais de 70% dos isolados clínicos de *E. faecium* são vancomicina-resistentes, com dados do NHSN 2018-2021 reportando até 77% de VRE em infecções associadas a dispositivos (CDC, 2019; CDC, 2023). Na Europa, o cenário é heterogêneo, embora alguns países mantenham índices relativamente baixos por meio de programas rigorosos de vigilância e de programa de uso otimizado de antibióticos (*antibiotic*

stewardship), surtos hospitalares são frequentes, e países como a Itália têm reportado percentuais elevados de VRE em isolados invasivos (Cimen et al., 2023).

A pandemia de COVID-19 introduziu um novo agravante a esse cenário, ao desorganizar fluxos hospitalares e demandar uso intensivo de antimicrobianos em pacientes graves, com relatos de aumento de infecções por VRE durante o período pandêmico (Fukushige et al., 2022). Em escala global, o VRE é hoje considerado um desafio crescente de saúde pública, com mortalidade significativamente elevada em comparação a infecções por enterococos sensíveis: revisões globais reportam taxas de até 60-70% em infecções de corrente sanguínea, embora estudos contemporâneos em coortes hospitalares específicas convirjam para valores entre 25% e 40% em bacteremia por VRE (Iqbal et al., 2024). Países do Sudeste Asiático e do Mediterrâneo Oriental reportam algumas das maiores prevalências globais em isolados de hemocultura (Haidari et al., 2022). Meta-análises recentes confirmam que a prevalência de cepas de *E. faecalis* resistentes a múltiplos antimicrobianos, incluindo a vancomicina, aumenta progressivamente ao longo do tempo, com diferenças significativas entre países e regiões (Guan et al., 2024).

3.2.3.2 Epidemiologia no Brasil

No Brasil, o primeiro isolamento de VRE foi reportado em 1996, em Curitiba, no estado do Paraná, seguido do primeiro relato em São Paulo, que ocorreu no ano seguinte. Nas décadas seguintes, o VRE consolidou-se como uma ameaça endêmica, sobretudo em unidades de terapia intensiva, com surtos progressivamente mais frequentes em hospitais terciários. O estudo multicêntrico prospectivo ASCENSION conduzido em 14 hospitais de quatro regiões brasileiras entre agosto de 2022 e agosto de 2023 documentou que a resistência à vancomicina em isolados de *E. faecium* de corrente sanguínea relacionados à assistência à saúde atinge níveis críticos, com VRE respondendo por mais de 90% dos isolados invasivos de *E. faecium* analisados. A disseminação está fortemente associada ao complexo clonal CC17, um agrupamento clonal hospitalar de alto risco amplamente reconhecido em *E. faecium* multirresistente em escala global (Antochevis et al., 2025).

Surtos regionais têm sido documentados em diferentes localidades do país. Em Salvador, na Bahia, um estudo descritivo identificou 15 pacientes infectados ou colonizados por VRE entre 2021 e 2023, incluindo isolados de *E. faecalis* com perfil

clonal portador do genótipo *vanA* (Silva et al., 2024). No Sul do Brasil, um surto de *E. faecium* VRE pertencente ao sequencia tipo 1133 (ST1133) acometeu pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda em ambiente hospitalar, ilustrando como populações imunocomprometidas são particularmente vulneráveis a clones resistentes circulantes (Vasconcelos et al., 2024). Para além do ambiente hospitalar, a resistência à vancomicina já foi reportada também em amostras de alimentos no país, sinalizando potencial de disseminação na comunidade: em levantamento de enterococos em alimentos realizado em Porto Alegre, uma cepa de *E. faecalis* resistente à vancomicina foi isolada de queijo colonial adquirido no comércio local (Riboldi et al., 2009).

Embora os dados epidemiológicos de VRE, tanto globais quanto brasileiros, sejam predominantemente referentes a *E. faecium*, historicamente, *E. faecalis* responde pela maior parte das infecções enterocócicas em geral, com destaque para infecções do trato urinário, endocardite e infecções de feridas cirúrgicas (Garcia-Solache et al., 2019; Geraldes et al., 2022). Do ponto de vista da virulência, é a espécie que apresenta o repertório mais diversificado de fatores de patogenicidade, incluindo capacidade de formação de biofilme, produção de gelatinase e citolisina, tornando-a modelo consolidado para o estudo de mecanismos de infecção enterocócica (Geraldes et al., 2022; Sadanandan et al., 2025).

3.3 Novos horizontes no combate às bactérias RAM

O cenário descrito até aqui sobre o desenvolvimento de novos antimicrobianos, pipeline clínico estagnado e dominado por derivados de classes já existentes (Melchiorri et al., 2024), aliado à prevalência crescente de patógenos multirresistentes como o VRE, torna evidente a urgência de buscar caminhos diferentes daqueles oferecidos pela farmacologia antibiótica clássica. Diante desse impasse, observa-se uma transição da inovação científica para estratégias não antibióticas, que atuam por mecanismos alternativos de combate às infecções bacterianas ou que potencializam terapias já existentes, reunidas sob o conceito de *beyond antibiotics* (Yarahmadi et al., 2025).

Entre essas estratégias, incluem-se a terapia por bacteriófagos, a imunoterapia com anticorpos monoclonais, os peptídeos antimicrobianos e os sistemas de nanoencapsulação, cada qual com perfis distintos de especificidade,

viabilidade clínica e estágio de desenvolvimento (Yarahmadi et al., 2025). Destacam-se, ainda, o uso de extratos vegetais, óleos essenciais e oleorresinas como adjuvantes ou substitutos de antimicrobianos convencionais, abordagem enraizada no uso milenar de plantas medicinais pelas mais diversas culturas humanas e que recupera crescente interesse científico e farmacológico diante dos desafios impostos pela resistência antimicrobiana.

A terapia combinada tem ressurgido como caminho especialmente promissor frente à resistência antimicrobiana (Si et al., 2023). Define-se sinergismo como a interação em que o efeito conjunto de dois compostos é superior à soma de seus efeitos isolados; aplicada ao contexto da RAM, essa interação permite reduzir as doses efetivas, restaurar a sensibilidade a fármacos contra os quais a bactéria já havia desenvolvido resistência e diminuir a toxicidade do tratamento (Yarahmadi et al., 2025; Si et al., 2023). Entre os mecanismos pelos quais um adjuvante natural pode potencializar a ação de um antibiótico, destacam-se três: (i) a inibição de bombas de efluxo bacterianas, que restaura a concentração efetiva do antimicrobiano no interior da célula; (ii) a perturbação da integridade da membrana citoplasmática, que compromete a homeostase bacteriana e favorece a penetração do fármaco; e (iii) a desestabilização de biofilmes, que reduz a tolerância intrínseca das células sésseis aos antimicrobianos (Si et al., 2023; Rashan et al., 2021). Essas propriedades têm sido amplamente documentadas em produtos naturais de origem vegetal, em especial extratos e óleos derivados de plantas medicinais, cujo potencial antimicrobiano e sinérgico constitui o foco das seções seguintes.

3.4 Oleorresinas

Para o presente estudo, convém estabelecer a distinção conceitual entre oleorresinas e óleos essenciais, duas classes de produtos naturais frequentemente confundidas na literatura leiga, mas quimicamente distintas e com perfis farmacológicos diferentes. Os óleos essenciais são a fração estritamente volátil obtida por destilação a vapor ou hidrodestilação de tecidos vegetais, sendo constituídos predominantemente por monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}) de baixo peso molecular. As oleorresinas, por outro lado, são exsudatos naturais de origem vegetal produzidos e armazenados em canais secretores especializados do xilema ou do córtex, secretados diretamente pela planta sem processamento posterior. Sua composição é bifásica: uma

fração volátil composta por sesquiterpenos como o *β*-cariofileno e uma fração não-volátil de alto peso molecular, rica em diterpenos ácidos (C_{20}) como o ácido copálico, o ácido caurenoico e o ácido hardwíckico (Frazão et al., 2023; da Trindade et al., 2018; Costa et al., 2011; Arruda et al., 2019).

Do ponto de vista biológico, a produção de oleorresinas constitui um mecanismo de defesa constitutivo e induzível, conservado em famílias como Fabaceae, Burseraceae e Pinaceae, às quais pertencem, respectivamente, os gêneros Copaifera, Boswellia e Pinus. Armazenadas em canais secretores especializados do xilema e do córtex, as oleorresinas são liberadas em resposta a ferimentos mecânicos, ataque de herbívoros ou infecção por fitopatógenos, atuando tanto na vedação física do tecido lesionado quanto na inibição química de microrganismos e insetos, função atribuída sobretudo aos diterpenos ácidos e sesquiterpenos que compõem sua matriz (da Trindade et al., 2018). Suas características organolépticas — consistência que varia de viscosa a fluida, coloração do amarelo-claro ao âmbar escuro e aroma resinoso intenso, atribuído à fração volátil sesquiterpênica — refletem diretamente essa composição bifásica e explicam o extenso histórico de uso etnofarmacológico dessas espécies. Compreender essa função ecológica original é relevante para o presente trabalho, pois a atividade antimicrobiana investigada nas seções seguintes corresponde, em essência, à mesma defesa química que a planta emprega contra seus próprios patógenos (da Trindade et al., 2018).

O emprego humano das oleorresinas acompanha de perto sua distribuição botânica e suas propriedades organolépticas, variando conforme o gênero produtor. A oleorresina de *Copaifera* (copaíba), além do uso medicinal consolidado na farmacopeia popular sul-americana, tem aplicação documentada nos setores de cosméticos e de vernizes (Pieri et al., 2009). A oleorresina de *Boswellia* (olíbano), tradicionalmente empregada como incenso em cerimônias religiosas e culturais desde a Antiguidade (Moussaieff; Mechoulam, 2009), é hoje também investigada quanto às suas propriedades antibacterianas (Rashan et al., 2023). Já as oleorresinas de espécies do gênero *Pinus* constituem historicamente a matéria-prima da indústria de gomas-resinas, processadas para a obtenção de terebintina e colofônia, empregadas por diversos setores industriais na fabricação de tintas, vernizes, adesivos e desinfetantes (da Silva et al., 2013). Esse padrão recorrente — a transição de um uso tradicional e empírico para a investigação sistemática das propriedades bioativas — reforça o valor histórico das oleorresinas como classe de produtos naturais e justifica sua permanência como

objeto de pesquisa farmacológica contemporânea.

3.4.1 Composição química das oleorresinas

Do ponto de vista químico, as oleorresinas do gênero *Copaifera* são substâncias bifásicas cujas duas frações possuem relevância biológica distinta e complementar. A fração volátil é constituída predominantemente por sesquiterpenos (C_{15}), sendo o *β*-cariofileno o composto majoritário na maior parte das amostras de *C. officinalis*, acompanhado do *α*-humuleno, *α*-copaeno, germacreno-D e *β*-elemeno, entre outros sesquiterpenos minoritários (Frazão et al., 2023; da Trindade et al., 2018). Essa fração sesquiterpênica, em razão de sua natureza lipofílica, contribui para a permeação celular dos demais componentes da oleorresina, particularmente nas membranas das bactérias-alvo. Evidências obtidas com o composto isolado sustentam essa leitura: em *Bacillus cereus*, o *β*-cariofileno purificado compromete a integridade da membrana celular, mecanismo descrito como base de sua ação antibacteriana (Moo et al., 2020); a atividade antimicrobiana do *β*-cariofileno isolado do óleo essencial de *Aquilaria crassna* já havia sido relatada anteriormente (Dahham et al., 2015). Além da atividade antibacteriana, o *β*-cariofileno é agonista seletivo do receptor canabinoide CB2, mecanismo ao qual se atribui sua ação anti-inflamatória (Gertsch et al., 2008). A fração não-volátil, por sua vez, é composta por diterpenos ácidos (C_{20}), incluindo o ácido copálico, o ácido caurenoico e o ácido hardwíckico, além do ácido polilático, diterpeno majoritário em espécies como *C. reticulata* e *C. duckei* (Frazão et al., 2023; da Trindade et al., 2018; Arruda et al., 2019). É a composição diterpênica, e não apenas a fração volátil sesquiterpênica, que distingue a oleorresina bruta dos óleos essenciais obtidos por destilação e que explica seu perfil farmacológico mais amplo, discutido nas seções seguintes.

3.4.2 Atividade antimicrobiana das oleorresinas

As oleorresinas representam uma das classes de produtos naturais com maior potencial antimicrobiano documentado frente a patógenos de prioridade clínica, incluindo bactérias multirresistentes. Sua atividade é atribuída à ação sinérgica entre a fração volátil sesquiterpênica e a fração não-volátil diterpênica, cujos componentes atuam de forma complementar sobre a membrana bacteriana, biofilmes e fatores de virulência (Frazão et al., 2023; Arruda et al., 2019). Entre os gêneros mais estudados

nesse contexto estão *Copaifera* e *Boswellia*, cujas oleorresinas, respectivamente conhecidas como copaíba e olíbano (frankincenso) acumulam amplo histórico de uso etnofarmacológico e crescente respaldo científico.

O espectro antibacteriano das oleorresinas de *Copaifera* spp. é consistentemente favorável a bactérias Gram-positivas: estudos comparativos demonstraram atividade bactericida frente a *S. aureus* (incluindo MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *E. faecalis*, com concentrações inibitórias mínimas variando de 31,3 a 62,5 µg/mL em espécies amazônicas (Santos et al., 2008). A menor atividade contra Gram-negativas é atribuída à barreira da membrana externa dessas bactérias, que limita a penetração dos compostos lipofílicos da oleorresina (Nazzaro et al., 2013; Nikaido, 2003). Esse perfil de seletividade posiciona a oleorresina de *C. officinalis* como candidata particularmente relevante para o estudo frente a patógenos como o *E. faecalis*, foco do presente trabalho.

No gênero *Boswellia*, a oleorresina de *B. sacra* demonstrou, além de atividade antibacteriana direta, capacidade de potencializar a ação de antibióticos convencionais contra patógenos gastrointestinais e bactérias desencadeadoras de doenças autoimunes, em ensaio de sinergismo por análise ∑FIC, indicando que essa oleorresina contém compostos modificadores de resistência (Rashan et al., 2023). Em paralelo, os ácidos boswélicos, terpenóides pentacíclicos derivados das oleorresinas de *Boswellia* spp. demonstraram atividade antibiofilme e antibacteriana sobre *S. epidermidis*, *E. faecalis* e *Escherichia coli*, com resultados comparados a antibióticos convencionais de referência (Kupcova et al., 2022). A oleorresina de *B. dalzielii* foi avaliada pela primeira vez frente ao patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* isolado de pacientes com doenças pulmonares, demonstrando atividade antimicrobiana e antibiofilme (Attallah et al., 2023).

3.4.3 Diterpenos de oleorresinas como inibidores de bombas de efluxo

As bombas de efluxo bacterianas são proteínas de membrana que expulsam ativamente antibióticos e outros compostos para o meio extracelular, reduzindo sua concentração intracelular a níveis subletais. Entre as famílias de maior relevância clínica em bactérias Gram-positivas está a superfamília dos facilitadores principais (do inglês *Major Facilitator Superfamily* - MFS), que inclui a bomba NorA de *S. aureus* e proteínas homólogas em *Enterococcus*. Sua superexpressão contribui diretamente para a falha terapêutica com fluoroquinolonas, compostos quaternários de amônio e

outros antimicrobianos (Dias et al., 2022). Revisão sistemática com protocolo PRISMA, abrangendo artigos publicados entre 2007 e 2022, identificou 75 terpenos diferentes com atividade inibitória sobre 22 bombas de efluxo distintas em 63 cepas bacterianas, demonstrando que compostos da classe dos terpenos, presentes nas oleorresinas, são inibidores de efluxo promissores (Dias et al., 2022).

No contexto específico dos diterpenos de oleorresinas, um diterpeno do tipo clerodano isolado de *Polyalthia longifolia,* esqueleto diterpênico também presente nas oleorresinas de *Copaifera* (ácido hardwíckico), foi documentado como modificador de resistência mediada por efluxo em MRSA, empregado nesses ensaios como modelo experimental, representando a primeira evidência de que diterpenos do tipo clerodano podem atuar como inibidores de efluxo em patógenos Gram-positivos (Dias et al., 2022). Cabe precisar que o efluxo constitui, nesse contexto, mecanismo adicional de resistência, associado à falha terapêutica com fluoroquinolonas e compostos quaternários de amônio, e não a via primária da resistência à meticilina. Embora estudos específicos avaliando diterpenos de *Copaifera* como inibidores de efluxo em *Enterococcus* ainda não tenham sido publicados, a analogia estrutural entre o ácido hardwíckico da copaíba e o diterpeno clerodano de *P. longifolia* sustenta a hipótese de que a fração diterpênica da oleorresina possa contribuir para a potenciação de antibióticos por esse mecanismo. Adicionalmente, o ácido betulínico, um triterpeno pentacíclico do tipo lupano, estruturalmente relacionado aos ácidos boswélicos das oleorresinas de *Boswellia* spp. demonstrou, em análises *in vitro* e *in silico*, capacidade de reduzir a concentração inibitória mínima (CIM) de norfloxacina e brometo de etídio em cepas de *S. aureus* portadoras da bomba NorA, além de influenciar a permeabilidade de membrana, sem apresentar atividade antibacteriana intrínseca significativa (da Silva et al., 2026). Esse padrão de adjuvância, sem atividade bactericida própria, é de particular interesse translacional, pois demonstra que terpenóides de oleorresinas podem potencializar antibióticos por vias independentes de sua atividade antibacteriana direta. Também o *β*-cariofileno, sesquiterpeno majoritário da oleorresina, tem sido associado à inibição de bombas de efluxo: foi descrito como inibidor da bomba NorA em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (Saldanha Filho et al., 2025) e avaliado em cepa de *S. aureus* portadora do gene QacA/B (Almeida-Bezerra et al., 2025), e nanoformulações lipossomais de trans-cariofileno e óxido de cariofileno foram testadas frente às bombas NorA, Tet(K), MsrA e MepA (Santana et al., 2024). Como esses achados foram obtidos em *S. aureus*, sua extrapolação para

Enterococcus permanece por demonstrar.

3.4.4 Desafios técnicos no trabalho com oleorresinas

O trabalho experimental com oleorresinas apresenta desafios técnicos específicos que diferem daqueles encontrados com os óleos essenciais e merecem registro. A natureza bifásica da oleorresina bruta, com componentes voláteis e não-voláteis de diferentes polaridades, torna sua dissolução em meios aquosos mais complexa do que a dos óleos essenciais simples. O uso de solventes orgânicos como o dimetilsulfóxido (DMSO) é necessário para a preparação de soluções-estoque em ensaios microbiológicos *in vitro*, desde que empregado em concentração controlada e acompanhado de controle negativo de solvente (Summer et al., 2022). A alta variabilidade composicional entre amostras de uma mesma espécie, influenciada por fatores genéticos, sazonalidade, localização geográfica e condições de extração, exige a caracterização química prévia por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para a fração volátil e por UHPLC-EM/EM para a fração diterpênica não-volátil, protocolos validados especificamente para oleorresinas de *Copaifera* por da Silva et al. (2017). Adicionalmente, a ausência de caracterização quantitativa da fração não-volátil em muitos estudos publicados limita a rastreabilidade dos compostos responsáveis pela atividade observada, tornando a fração diterpênica um alvo prioritário de investigação em trabalhos de mecanismo de ação.

3.5 O gênero *Copaifera* L. e a espécie *Copaifera officinalis*

Entre as plantas medicinais com longa tradição etnofarmacológica e crescente respaldo científico, a copaíba, pertencente ao gênero *Copaifera* L., ocupa posição de destaque na Amazônia brasileira e na medicina popular sul-americana. Conhecida há mais de cinco séculos por suas propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, a copaíba produz uma oleorresina como distiguida dos óleos essenciais tratados na seção anterior, com composição química e propriedades farmacológicas próprias (Frazão et al., 2023; Arruda et al., 2019).

3.5.1 Biologia do gênero *Copaifera* e *Copaifera officinalis*

O gênero *Copaifera* L. (família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae) (Figura 7A) compreende espécies arbóreas nativas de regiões tropicais da América Latina e África, com maior diversidade concentrada na bacia amazônica brasileira, onde são descritas mais de 70 espécies, sendo 16 exclusivas do Brasil (da Trindade et al., 2018). A *Copaifera officinalis* (Figura 7B) apresenta distribuição predominantemente norte-amazônica, ocorrendo no escudo das Guianas, Venezuela, Colômbia e norte do Brasil, sobretudo Roraima e Amapá, com registros adicionais na Bolívia e em Trinidad e Tobago (da Trindade et al., 2018).

Essa distribuição difere substancialmente das outras duas espécies mais frequentes na literatura: *C. langsdorffii*, predominante no Cerrado e nos estados do Sudeste brasileiro, e *C. reticulata* Ducke, restrita à Amazônia central, distinção metodologicamente relevante, uma vez que dados farmacológicos dessas espécies são frequentemente extrapolados para *C. officinalis* na literatura, a despeito das diferenças composicionais entre as três (Frazão et al., 2023). A *C. officinalis* é também uma das espécies mais utilizadas na medicina tradicional e na produção comercial da oleorresina, cuja aplicação, além do uso medicinal, alcança setores industriais como o de cosméticos e o de vernizes (Pieri et al., 2009).

Conhecida popularmente como “antibiótico da mata”, a copaíba possui histórico de uso etnofarmacológico documentado desde o século XVI: a primeira referência data de 1534, e o padre José de Anchieta já relatava seu poder cicatrizante em fins de 1560 (Pieri et al., 2009). Essa longa tradição de uso, associada ao acúmulo de evidências científicas sobre sua atividade biológica, sustenta o interesse contínuo pela copaíba como fonte de compostos com potencial terapêutico, particularmente no contexto da resistência antimicrobiana.

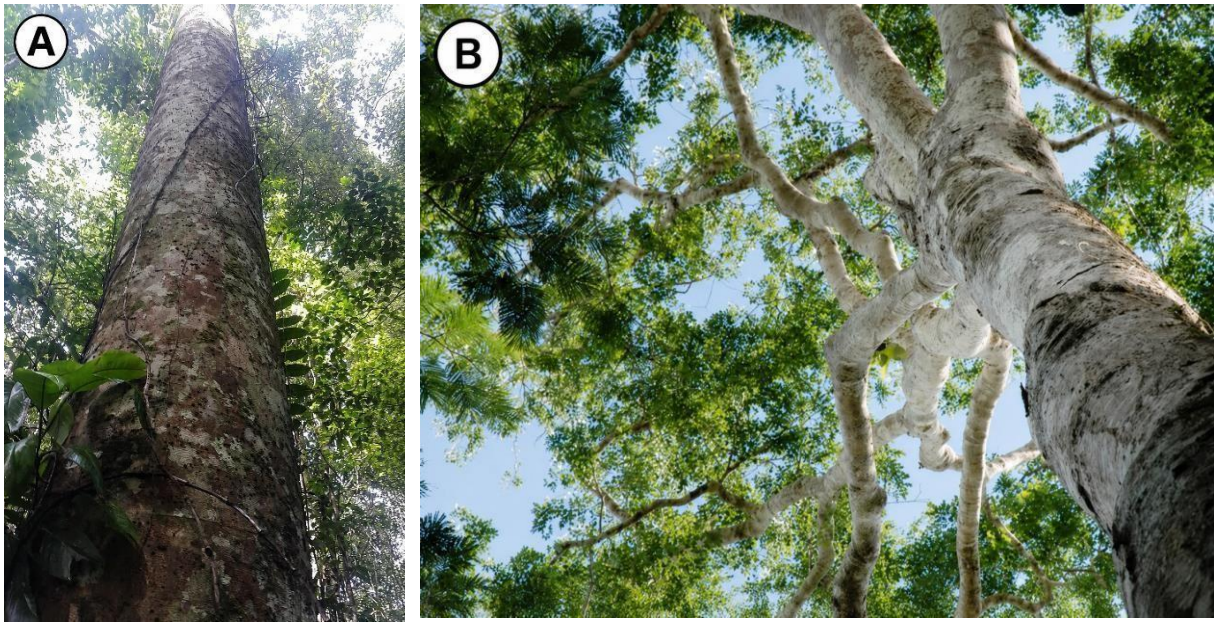


Figura 7. Aspectos morfológicos de espécies do gênero Copaifera. (A) Vista do fuste de um indivíduo do gênero *Copaifera* L. em ambiente de floresta tropical, evidenciando o porte arbóreo elevado, a casca com textura rugosa e a ramificação característica da copa. (**B)** Tronco e copa *de Copaifera officinalis*, com destaque para a coloração esbranquiçada da casca externa e a arquitetura ramificada típica da espécie em condições de maior luminosidade. **Fonte: (A)** Lira-Guedes (2020a). **(B)** Santiago et al.

3.5.2 Oleorresinas de copaíba: distinções químicas entre espécies e seus perfis antimicrobianos

A oleorresina característica do gênero *Copaifera* (Figura 8A) é produzida e armazenada em canais secretores distribuídos no xilema secundário do tronco, onde funciona como mecanismo de defesa natural da planta contra predadores, fungos e bactérias (da Trindade et al., 2018; Costa et al., 2011; Rodrigues et al., 2009). A extração é realizada de forma sustentável por meio da perfuração do tronco com um trado (Figura 9A) até atingir a região do cerne, por onde a oleorresina escoa livremente por gravidade (Figura 8B); ao término da coleta, os orifícios são vedados com argila ou tampa plástica, permitindo colheitas sucessivas sem causar dano permanente à árvore (Rodrigues et al., 2009).

Ao emergir do canal secretor, a oleorresina bruta apresenta coloração amarelo-dourada a âmbar, transparência característica e viscosidade fluida que permite seu escoamento espontâneo — propriedades diretamente relacionadas à predominância sesquiterpênica da fração volátil (Figura 9C). Para comercialização e

uso em pesquisa experimental, o produto é habitualmente acondicionado em frascos de vidro âmbar com conta-gotas (Figura 9D), embalagem que protege os componentes sesquiterpênicos voláteis da degradação fotoquímica induzida pela luz. O rendimento varia substancialmente entre indivíduos e entre espécies do gênero, em função de fatores genéticos, ambientais e do estado fisiológico do exemplar (da Trindade et al., 2018; Costa et al., 2011).



Figura 8. Etapas de obtenção da oleorresina de copaíba e produto comercial. (**A**) Operação de perfuração do tronco com trator motorizado. **(B)** Coleta da oleorresina. (**C)** Oleorresina bruta. (**D)** Versão comercializada da oleorresina de copaíba em frasco com conta-gotas, ilustrando a forma de acondicionamento tipicamente adotada para comercialização. **Fonte: (A)** Lira-Guedes (2020b) **(B)** Lira-Guedes (2019) **(C)** Rocha (2017) **(D)** Plumerya® Óleos Essenciais, s.d.

Entre as espécies do gênero *Copaifera*, a *C. officinalis* apresenta perfil composicional distinto das congêneres mais estudadas na literatura farmacológica. Enquanto *C. reticulata* e *C. duckei* são caracterizadas pela predominância do ácido polialtico na fração diterpênica, *C. officinalis* tende a apresentar maior proporção relativa de sesquiterpenos na fração volátil, sendo o *β*-cariofileno o composto majoritário, podendo representar parcela substancial da fração volátil em diversos perfis quimiotípicos, acompanhado de *α*-humuleno, *α*-copaeno, germacreno-D e *δ*-cadineno

(da Trindade et al., 2018; Costa et al., 2011; Pieri et al., 2009). Essa dominância sesquiterpênica distingue *C. officinalis* de espécies do cerrado como *C. langsdorffii*, nas quais a fração não-volátil de diterpenos ácidos, ácido copálico, caurenoico e hardwíckico, tende a ser proporcionalmente mais expressiva (da Trindade et al., 2018; Arruda et al., 2019). Essa diferença composicional entre espécies tem implicação direta para a atividade antimicrobiana esperada: na fração volátil, o *β*-cariofileno age predominantemente por interações hidrofóbicas com a bicamada lipídica, aumentando a permeabilidade e provocando extravasamento de conteúdo intracelular; na fração não-volátil, os diterpenos ácidos atuam de forma complementar na desestabilização da parede celular e da membrana citoplasmática, com contribuições adicionais à inibição de biofilme (Pfeifer Barbosa et al., 2019; Ruhal et al., 2024).

Os dados de atividade antibacteriana disponíveis para as oleorresinas de *Copaifera* frente a *Enterococcus* são escassos e metodologicamente heterogêneos, o que dificulta comparações diretas. Santos et al. (2008) reportaram CIM de 31,3 a 62,5 µg/mL para oleorresinas de espécies amazônicas *C. martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata* coletadas no Acre, frente a bactérias Gram-positivas. Em contraste, Masson et al. (2013) obtiveram CIM de 1.100 µg/mL e CBM de 1.200 µg/mL para *E. faecalis* sensível aos antibióticos ao ser testado com a oleorresina de *C. langsdorffii*. Essa disparidade de mais de uma ordem de grandeza reflete, em grande parte, as diferenças composicionais entre espécies amazônicas ricas em sesquiterpenos e espécies do Cerrado com maior proporção de diterpenos ácidos na fração não-volátil, mas também variações de protocolo microbiológico e cepa bacteriana. Em estudos mais recentes com isolados de *C. reticulata* e de *C. duckei*, os diterpenos isolados ácido copálico e ácido caurenoico apresentaram CIM e concentração bactericida mínima (CBM) entre 12,5 e 50 µg/mL frente a *E. faecium* MDR respectivamente, com inibição de biofilme em mais de 50% (Abrão et al., 2018; Pfeifer Barbosa et al., 2019).

3.6 Atividade de *Copaifera officinalis* frente a *Enterococcus*: lacunas e perspectivas

Embora a atividade antimicrobiana da oleorresina de copaíba seja objeto de investigação há décadas, os estudos disponíveis concentram-se predominantemente em *S. aureus* e em patógenos do ambiente oral, com dados escassos sobre o gênero *Enterococcus* e praticamente inexistentes para linhagens

resistentes à vancomicina (Frazão et al., 2023). Os poucos trabalhos que testaram *Copaifera* spp. frente a *E. faecalis* o fizeram com isolados sensíveis e em contextos clínicos distintos do presente estudo. Masson et al. (2013) avaliaram a oleorresina de *C. langsdorffii* contra bactérias associadas a úlceras cutâneas, obtendo concentração inibitória mínima de 1.100 µg/mL e CBM de 1.200 µg/mL para *E. faecalis* sensível. Esse valor é consideravelmente superior ao intervalo de 31,3–62,5 µg/mL reportado por Santos et al. (2008) para oleorresinas de espécies congênericas do Acre, disparidade que reflete as diferenças composicionais esperadas entre *C. langsdorffii,* espécie predominante no Cerrado, com maior proporção de diterpenos ácidos na fração não-volátil e as espécies amazônicas ricas em sesquiterpenos, além das variações metodológicas de protocolo e linhagem bacteriana empregada. Não foram encontrados, até o momento da presente revisão, estudos que avaliem especificamente a atividade da oleorresina de *C. officinalis* frente a isolados de VRE, o que configura uma lacuna relevante, considerando tanto a emergência global desse patógeno quanto o potencial antimicrobiano já documentado para o gênero *Copaifera*. Diante da crise global de resistência antimicrobiana, da escassez de opções terapêuticas frente ao VRE e da ausência de dados específicos sobre *C. officinalis* frente a isolados de *E. faecalis* sensíveis e resistentes à vancomicina, coloca-se a seguinte pergunta: A oleorresina de *C. officinalis* apresenta atividade antimicrobiana sobre isolados clínicos de *E. faecalis* VSE e VRE, produz efeitos sinérgicos, antagônicos ou é neutra em associação com antibióticos convencionais, e é capaz de alterar a integridade da membrana e a estrutura do biofilme dessas cepas?

O presente trabalho propõe avaliar, por meio de ensaios de CIM, a atividade da oleorresina desta espécie sobre isolados clínicos de *E. faecalis* VSE e VRE. Ensaios de sinergismo e antagonismo com antibióticos de uso clínico serão conduzidos para verificar se a oleorresina potencializa, neutraliza ou interfere na ação dos antimicrobianos convencionais, fornecendo subsídios para possíveis aplicações adjuvantes. A análise por microscopia confocal com iodeto de propídio e diacetato de fluoresceína permitirá investigar a integridade da membrana bacteriana nas amostras tratadas e, simultaneamente, caracterizar a estrutura do biofilme formado pelas cepas estudadas, contribuindo para a compreensão dos mecanismos de ação envolvidos e do impacto da oleorresina sobre essa forma de crescimento bacteriano de especial relevância clínica. Os resultados esperados poderão oferecer bases para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas ou adjuvantes no enfrentamento

das infecções por VRE.

4 METODOLOGIA

4.1 Oleorresina de *Copaifera officinalis*

A oleorresina de *Copaifera officinalis* utilizada nos experimentos foi adquirida comercialmente (Plumerya® Óleos Essenciais, Brasil), sendo empregado um único lote (lote 010) em todos os ensaios, assegurando uniformidade da composição química ao longo do estudo. O produto foi armazenado em frasco âmbar, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente controlada, conforme recomendações do fabricante. A padronização de lotes comerciais apoia-se em métodos cromatográficos de caracterização e de quantificação dos marcadores sesquiterpênicos e diterpênicos da oleorresina (Sousa et al., 2011; Lee et al., 2023).

A escolha do produto comercial foi baseada na disponibilização de laudo cromatográfico individualizado por lote, permitindo rastreabilidade e caracterização química do material empregado. A análise da fração volátil foi realizada por cromatografia gasosa de alta resolução com detector de ionização em chama (CG-FID).

Para os ensaios microbiológicos, foi preparada solução estoque contendo 20% (v/v) de oleorresina e 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO), completada com água destilada estéril. O DMSO foi empregado como cossolvente em razão da baixa solubilidade da oleorresina em meio aquoso. A solução foi homogeneizada por agitação imediatamente antes de cada uso para garantir a distribuição uniforme do composto.

A possível interferência do DMSO sobre o crescimento bacteriano foi avaliada separadamente, por ensaio de microdiluição em caldo Mueller-Hinton (MHC), utilizando suspensão bacteriana padronizada a 0,5 na escala de McFarland (≈1,5 × 10^8 UFC/mL) por turbidimetria, nas mesmas condições empregadas nos ensaios de concentração inibitória mínima. Os controles de solvente foram realizados em triplicata independente.

4.2 Cepas empregadas nos ensaios e condições de cultivo

No presente estudo, foram utilizadas doze cepas bacterianas, sendo oito Gram-positivas, incluindo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29231, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, além

de quatro cepas VSE e quatro VRE, e três cepas Gram-negativas, incluindo *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* INCQS 0031.

As cepas eram provenientes da bacterioteca do laboratório e estavam conservadas em estoque congeladas em glicerol a −20°C. Para reativação, as cepas foram semeadas em meio ágar Infusão de Cérebro e Coração (*Brain Heart Infusion Agar* -BHIA) e incubadas a 37°C por 24 h.

4.2.1 Cepas *E. faecalis* sensíveis e resistentes à vancomicina

As cepas oito cepas clínicas de *E .faecalis* avaliadas eram provenientes de amostras de urina e sangue, pertencentes à coleção da bacterioteca do laboratório, sendo as cepas VSE foram identificadas como 485, 586, 633, 1220 e as VRE como 1854, 1950, 2074 e 2390 (Tabela 1).

Tabela 1. Relação cepa-origem clínica das amostras utilizadas no estudo.

Cepa	Origem Clínica	Classificação
485	**Urina**	**VSE**
586	**Urina**	**VSE**
633	**Urina**	**VSE**
1220	**Escarro**	**VSE**
1854	**Urina**	**VRE**
1950	**Urina**	**VRE**
2074	**Sangue**	**VRE**
2390	**Sangue**	**VRE**

A confirmação da identidade em nível de espécie dos isolados foi realizada por espectrometria de massas do tipo *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF), utilizando equipamento *Microflex LT* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), operado com o sistema MALDI Biotyper 4.0. As cepas bacterianas foram preparadas pelo método de extração em etanol absoluto. Colônias isoladas foram

transferidas para tubos de microcentrífuga e ressuspensas em etanol absoluto. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em etanol absoluto, obtendo-se as suspensões proteicas utilizadas para análise. As suspensões foram entregues à técnica responsável pelo equipamento, que realizou a deposição em placa-alvo MALDI, a aquisição espectral e o processamento dos dados por meio dos softwares flexControl e MALDI Biotyper Real Time Classification (RTC), ambos da *Bruker Corporation*, Bremen, Alemanha.

Foram considerados para inclusão no estudo apenas as cepas que apresentaram escore de identificação ≥ 2,0, correspondente à identificação confiável em nível de espécie segundo os critérios do fabricante. Isolados com escore inferior a esse limiar foram excluídos das análises subsequentes.

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelo método de difusão em disco em ágar Mueller-Hinton cátion-ajustado (MHA-CA), conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M100 (33ª ed., 2023), utilizando os critérios interpretativos específicos para *Enterococcus* spp.

As cepas foram reativadas por repique em ágar BHI a 37°C por 24h. A partir de colônias isoladas, foi preparada suspensão bacteriana em solução salina estéril 0,9%, ajustada à turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland (≈1,5 × 10^8 UFC/mL), verificada por turbidimetria. A suspensão bacteriana foi semeada uniformemente na superfície de placas de Petri de 150 mm contendo cerca de 20 mL MHA-CA, utilizando *swab* estéril. Foram utilizados discos comerciais contendo os seguintes antimicrobianos: tetraciclina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), ampicilina (10 µg), eritromicina (15 µg), cloranfenicol (30 µg), vancomicina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), gentamicina (120 µg) e estreptomicina (300 µg). Após aplicação dos discos, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Os ensaios foram realizados em triplicata independente.

Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em milímetros com auxílio de régua milimetrada, e os resultados foram interpretados conforme os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI para *Enterococcus* spp. Para fins de agrupamento experimental, os isolados foram classificados exclusivamente com base no perfil de suscetibilidade à vancomicina, sendo categorizados como sensíveis à vancomicina (VSE) ou resistentes à vancomicina (VRE). Os demais perfis de susceptibilidade observados foram registrados, mas não utilizados como critério de seleção ou

agrupamento.

4.3 Ensaio de atividade antibacteriana da oleorresina de *C. officinalis* por difusão em disco

A atividade antibacteriana da oleorresina de *C. officinalis* foi avaliada preliminarmente por ensaio qualitativo de difusão em disco, com o objetivo de verificar a presença ou ausência de inibição do crescimento bacteriano frente a diferentes espécies bacterianas. Este ensaio seguiu o protocolo descrito por Negreiros (2014).

Neste ensaio foram utilizadas as oito cepas Gram-positivas, incluindo *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29231, *B. cereus* ATCC 14579, *L. monocytogenes* ATCC 7644, bem como as Gram-negativas, incluindo *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* INCQS 0031. As cepas foram reativadas por repique em ágar Triptona de Soja (*Tryptic Soy Agar* -TSA), com incubação a 37°C por 24h.

A partir das colônias obtidas, foi preparada suspensão bacteriana em solução salina estéril 0,9%, ajustada à turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland (≈1,5 × 10^8 UFC/mL), verificada por turbidimetria. A suspensão foi distribuída uniformemente sobre a superfície de placas contendo ágar Mueller-Hinton (MHA) com auxílio de *swab* estéril. Discos de papel absorvente de uso laboratorial, preparados artesanalmente com aproximadamente 6 mm de diâmetro e previamente esterilizados, foram impregnados com 5 µL de oleorresina pura e aplicados imediatamente sobre o meio inoculado, sem etapa de secagem prévia. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h.

Após o período de incubação, foi realizada avaliação qualitativa quanto à presença ou ausência de halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor dos discos. Os ensaios foram realizados em triplicata independente.

4.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) da oleorresina de *C. officinalis* foi determinada nas cepas VSE e VRE pelo método de microdiluição em MHC, utilizando placas de 96 poços com fundo em "U", conforme adaptação do protocolo de microdiluição em caldo do CLSI, documento M07, para produtos naturais de baixa

solubilidade aquosa (Balouiri et al., 2016; CLSI, 2018).

A solução estoque da oleorresina (20% v/v em 10% de DMSO, conforme descrito na seção 4.1) foi utilizada como ponto de partida das diluições. Na coluna 2 de cada placa foram adicionados 100 µL da solução estoque, sem adição de inóculo bacteriano. Nas colunas 3 a 8 foram adicionados previamente 50 µL de MHC. Com uma pipeta multicanal, 50 µL da solução estoque da oleorresina foi diluído nos poços da coluna 3, e da coluna 3 até a 8, foram seguidas diluições seriadas na proporção 1:2, transferindo-se 50 µL da coluna anterior para a coluna seguinte, com homogeneização por pipetagem por 5 vezes em cada etapa e descarte dos 50 µL finais para manutenção do volume constante. As concentrações finais testadas após adição do inóculo variaram de 5% a 0,15625% (v/v).

Após as diluições, foram adicionados 50 µL de suspensão bacteriana em solução salina estéril 0,9%, ajustada a 0,5 na escala de McFarland (≈1,5 × 10^8 UFC/mL), verificada por turbidimetria, a todos os poços das colunas 3 a 8, resultando em volume final de 100 µL por poço e densidade de inóculo de (≈7,5 × 10^7 UFC/mL, sem etapa intermediária de diluição da suspensão padronizada. A coluna 1 foi utilizada como controle positivo de crescimento, contendo 50 µL de MHC e 50 µL de suspensão bacteriana, sem oleorresina. A última coluna foi utilizada como controle negativo de esterilidade, contendo 50 µL de MHC e 50 µL de solução salina estéril, sem inóculo bacteriano.

Paralelamente, foi realizado controle do solvente, submetendo solução de DMSO a 10% em água destilada estéril ao mesmo esquema de diluições seriadas, com adição de 50 µL de suspensão bacteriana a cada poço, nas mesmas condições experimentais descritas para a oleorresina.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24h. A leitura foi realizada por inspeção visual da turbidez, utilizando como referência a presença ou ausência de sedimento no fundo dos poços. A CIM foi definida como a menor concentração da oleorresina capaz de inibir visivelmente o crescimento bacteriano. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três momentos experimentais distintos.

4.5 Avaliação qualitativa do efeito bactericida

Após a determinação da CIM, o conteúdo dos poços correspondentes a todas as concentrações testadas (5% a 0,15625%), bem como dos controles experimentais, foi recolhido com alça de platina e semeado por estriamento em MHA,

com incubação a 37°C por 24 h. As placas foram avaliadas quanto à presença ou ausência de crescimento bacteriano. Esse procedimento teve caráter qualitativo e exploratório, com o objetivo de verificar se a inibição observada na CIM era acompanhada de atividade bactericida detectável por subcultivo, não constituindo determinação formal da concentração bactericida mínima (CBM) (CLSI, 1999; Peterson et al., 1992).

4.6 Teste de sinergismo e antagonismo com antibióticos

A avaliação das possíveis interações entre a oleorresina de *C. officinalis* e antibióticos convencionais frente às cepas VSE e VRE foi realizada por ensaio de dupla difusão em disco, com caráter exploratório de triagem (Hulankova, 2024; CLSI, 1999).

Neste teste foram avaliados os mesmos nove antimicrobianos utilizados no antibiograma: tetraciclina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), ampicilina (10 µg), eritromicina (15 µg), cloranfenicol (30 µg), vancomicina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), gentamicina (120 µg) e estreptomicina (300 µg), testados individualmente em relação à oleorresina.

Placas de Petri de 100 mm contendo MHA-CA foram inoculadas com suspensão bacteriana em solução salina estéril a 0,9%, ajustada para 0,5 McFarland (≈1,5 × 10^8 UFC/mL), confirmada por turbidimetria e distribuída uniformemente na superfície do meio. Em cada placa, foram colocados dois discos, espaçados 20 mm entre si: um disco contendo o antimicrobiano e um disco de papel preparado como descrito para o ensaio de difusão em disco, impregnado com 5 µL da solução de oleorresina, nas concentrações correspondentes à CIM para cada grupo experimental (1,25% para VSE e 2,5% para VRE).

As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em milímetros. Para obtenção dos halos de referência individuais, foi realizado simultaneamente antibiograma em placas de 150 mm, nas mesmas condições descritas na seção 4.5, e ensaio com disco de oleorresina isolada em placa de 100 mm, sem antibiótico associado, utilizando a mesma concentração empregada no ensaio combinado para cada grupo.

A interpretação das interações foi baseada na comparação dos diâmetros dos halos obtidos no ensaio combinado com os halos individuais de cada agente. Foi considerado efeito sinérgico o aumento ≥ 2 mm em pelo menos um dos halos;

antagonismo quando houve redução ≥ 2 mm em pelo menos um dos halos; e neutro quando as variações foram inferiores a esse limiar — critério adotado como limiar mínimo de variação detectável para matrizes hidrofóbicas nas condições do ensaio. Os ensaios foram realizados em triplicata, em dias alternados, sem análise estatística formal, sendo os resultados interpretados de forma comparativa.

4.7 Avaliação da integridade da membrana bacteriana por microscopia confocal de varredura a laser e efeito antibiofilme

A integridade da membrana bacteriana de isolados de *E. faecalis* VSE e VRE após exposição à oleorresina de *C. officinalis* foi avaliada por microscopia confocal de varredura a laser, utilizando coloração por dupla fluorescência com iodeto de propídio (PI) e diacetato de fluoresceína (FDA). O ensaio foi realizado em biofilmes formados sobre superfície de vidro, permitindo avaliação estrutural tridimensional das células tratadas.

4.7.1 Formação do biofilme

As cepas foram reativadas a partir dos estoques congelados em glicerol a −20°C por inoculação em BHIB, com incubação a 37°C por 24h, seguida de repique em BHIA por igual período. Colônias isoladas foram suspensas em solução salina estéril 0,9% e ajustadas à turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland (≈1,5 × 10^8 UFC/mL), verificada por turbidimetria.

O biofilme foi formado em placas de cultivo celular com fundo de lamínula de vidro de 0,17 mm de espessura (CellView, Greiner Bio-One, Áustria, ref. 627870), compatíveis com microscopia confocal invertida (Figura 9). Em cada poço foram adicionados 200 µL de BHIB suplementado com 1% de glicose e 200 µL da suspensão bacteriana. As placas foram incubadas a 37°C por 72h, com troca do meio de cultura a cada 24h. Cada par de poços foi utilizado como duplicata para cada isolado e controles do experimento.

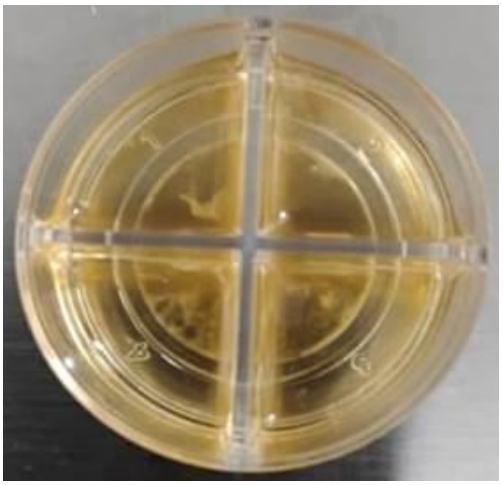


Figura 9. Placa de cultivo celular com fundo de lamínula. Esta placa permite a visualização de células aderidas na superfície do vidro, que possui espessura de 0,17 mm, permitindo observação por microscópio confocal invertido.

4.7.2 Tratamento com oleorresina

Após as 72h de formação do biofilme, o meio de cultura foi cuidadosamente removido pelas laterais de cada poço para preservar a estrutura do biofilme aderido. Os poços foram lavados delicadamente com 400 µL de tampão fosfato-salino (PBS) para remoção de células não aderidas.

Para cada uma das oito cepas, foram aplicados os seguintes tratamentos, com incubação por 2h em temperatura ambiente como apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Composição dos tratamentos controle e com a CIM da oleorresina.

Tratamento	Grupo	Concentração Oleorresina	Vol. DMSO	Vol. Etanol 70%	Vol. estoque MIC	Vol. PBS
Controle positivo (PBS)	VSE VRE	— —	—	—	—	400 µL
Controle negativo (etanol 70%)		—	—	400 µL	—	—
Controle DMSO MIC	VSE VRE	— —	2,5 µL 5 µL	— —	— —	397,50 µL 395 µL
Controle DMSO 2× MIC	VSE VRE	— —	5 µL 10 µL	— —	— —	395 µL 390 µL
Oleorresina MIC	VSE VRE	1,25% 2,5%	— —	— —	25 µL 50 µL	375 µL 350 µL
Oleorresina 2× MIC	VSE VRE	2,5% 5 %	— —	— —	50 µL 100 µL	350 µL 300 µL

— : Não se aplica (ausência de adição da solução correspondente ao tratamento).

As soluções de oleorresina foram preparadas a partir da solução estoque (20% de oleorresina em 10% de DMSO) com diluição em PBS. Os controles de DMSO foram preparados com volumes equivalentes de DMSO puro diluído em PBS, nas mesmas concentrações de solvente presentes nas respectivas soluções de oleorresina. Foi realizado um único controle negativo universal para o experimento com a adição de 400µL de etanol 70% por 2h.

4.7.3 Marcação por dupla fluorescência e aquisição das imagens

Após os tratamentos, cada poço foi lavado três vezes com 400 µL de PBS. As células foram coradas com solução contendo 3 µL de PI e 8 µL de FDA em 379 µL de PBS, com incubação em temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação, cada poço foi novamente lavado três vezes com PBS para remoção dos resíduos dos corantes, e 400 µL de PBS foram mantidos em cada poço para manter as células em condições osmótica e tamponada adequadas durante o período de aquisição das imagens.

As imagens foram adquiridas em microscópio confocal de varredura a laser invertido Olympus FV1000, utilizando o software *FluoView SW-10*. Foram empregados laser de 473 nm para detecção de FDA (fluorescência verde, células com membrana íntegra) e laser de 554 nm para detecção de PI (fluorescência vermelha, células com membrana comprometida). A objetiva utilizada foi de UPLSAPO S 60×, com tamanho de imagem de 532 × 532 pixels. As imagens foram adquiridas no modo *Z-stack*, permitindo reconstrução tridimensional dos biofilmes.

Para cada poço, foram adquiridas imagens em três regiões padronizadas (Figura 10), selecionadas com base na melhor aderência do biofilme à superfície de vidro, possivelmente favorecida pela interface vidro/plástico da placa, e pela possibilidade de padronização do local de aquisição entre os poços. Todas as imagens foram obtidas com as mesmas configurações de aquisição em sessão experimental única.

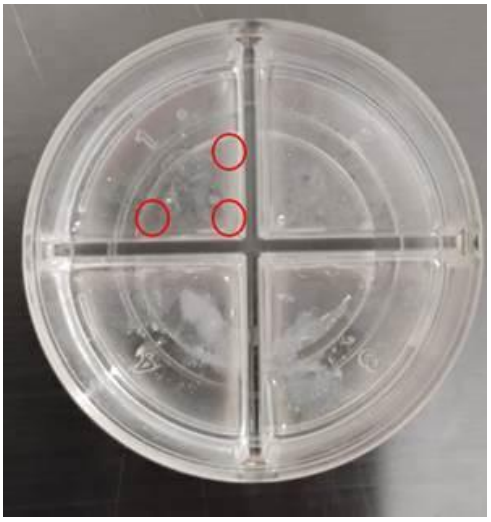


Figura 10. Placa pronta para aquisição das imagens por microscopia confocal.

4.7.4 Análise quantitativa das imagens por microscopia confocal

A análise quantitativa das imagens de microscopia confocal foi realizada a partir dos arquivos brutos no formato TIFF multicanal de 16 bits (resolução efetiva de 12 bits; faixa dinâmica de 0 a 4.095 unidades arbitrárias — UA) exportados pelo software FluoView SW-10 (Olympus Corporation, Japão). Os arquivos foram processados por meio de rotina computacional em linguagem Python 3, utilizando a biblioteca *tifffile* para leitura dos dados e a biblioteca *NumPy* para os cálculos de intensidade de fluorescência. Cada arquivo continha dois canais de fluorescência adquiridos sequencialmente, correspondentes aos dois fluorocromos utilizados na marcação do biofilme: o canal 0, referente ao sinal verde do diacetato de fluoresceína (FDA; excitação a 473 nm), indicativo de atividade metabólica celular; e o canal 1, referente ao sinal vermelho do iodeto de propídio (IP; excitação a 559 nm), indicativo de permeabilização ou ruptura da membrana plasmática.

4.7.4.1 Padronização do eixo Z

Os biofilmes analisados apresentaram espessuras variáveis entre condições e isolados, resultando em número distinto de planos de aquisição ao longo do eixo Z (profundidade do biofilme) entre os diferentes grupos experimentais. Para garantir que todas as comparações fossem realizadas sobre volumes equivalentes de biofilme, a análise foi padronizada para os primeiros 20 planos Z de cada aquisição, independentemente do número total de planos disponíveis. Quando o número de planos era inferior a 20, todos os planos disponíveis foram incluídos. Esse procedimento é necessário porque imagens com maior número de planos acumulariam maior intensidade total simplesmente pela maior profundidade amostrada, e não necessariamente por maior atividade ou maior dano celular, introduzindo um viés sistemático na comparação entre grupos.

4.7.4.2 Métricas de fluorescência

Para cada imagem padronizada, foram calculadas, separadamente para os dois canais, as métricas descritas na Tabela 3. O limiar de background (fundo de imagem) foi fixado em 41 UA, equivalente a 1% do valor máximo da escala de 12 bits, adotado como referência para excluir o ruído eletrônico do detector fotomultiplicador e

delimitar os pixels com sinal biologicamente relevante em cada canal.

Tabela 3. Métricas de fluorescência calculadas por canal em cada imagem confocal, com definição e interpretação biológica

Métrica	Definição	Interpretação
FDA médio (UA)	Intensidade média de todos os pixels do canal verde (Ch0) nos primeiros 20 planos Z. Escala 0–4.095 (12 bits).	Valores altos = biofilme metabolicamente ativo (células vivas). Valores próximos de zero = ausência de atividade esterásica.
IP médio (UA)	Intensidade média de todos os pixels do canal vermelho (Ch1) nos primeiros 20 planos Z. Mesma escala.	Valores altos = células com membrana comprometida ou DNA extracelular abundante na matriz do biofilme.
Cobertura de sinal (%)	Proporção de pixels com intensidade > 41 UA (limiar de background = 1% do range máximo).	Indica a área relativa do biofilme com sinal fluorescente detectável em cada canal.
Razão IP/FDA	Quociente entre a intensidade média do IP e a do FDA. Parâmetro central da análise.	< 1,0: células vivas predominam. > 1,0: células com membrana comprometida predominam (inversão).

4.7.4.3 Razão IP/FDA como índice de integridade de membrana

O parâmetro central da análise quantitativa foi a razão IP/FDA, obtida pelo quociente entre a intensidade média do canal IP (vermelho) e a intensidade média do canal FDA (verde). Esse índice integra simultaneamente os dois sinais de fluorescência em um único valor que reflete o equilíbrio entre células com membrana íntegra e metabolicamente ativas (representadas pelo FDA) e células com membrana comprometida (representadas pelo IP). Valores de razão IP/FDA inferiores a 1,0 indicam que o sinal verde é predominante, ou seja, que as células vivas são mais abundantes no campo analisado; valores superiores a 1,0 indicam inversão desse equilíbrio, com o sinal vermelho dominando, o que evidencia que as células com membrana danificada ou rompida superam as células metabolicamente ativas — condição aqui denominada **inversão da razão IP/FDA**. O valor de 1,0 representa o ponto de equivalência entre os dois sinais, constituindo o limiar analítico de referência.

É relevante considerar que, no contexto específico de biofilmes, o IP não marca exclusivamente células mortas. Parte do sinal vermelho é originada do DNA extracelular (eDNA) presente na matriz extracelular do biofilme, que é um componente estrutural natural produzido e acumulado ao longo do desenvolvimento da comunidade bacteriana. Por essa razão, a razão IP/FDA deve ser interpretada como um indicador de integridade de membrana da comunidade bacteriana como um todo, e não como uma contagem direta de células mortas. Essa ressalva é especialmente relevante para os controles positivos, nos quais algum sinal de IP pode ser detectado mesmo sem tratamento.

4.7.4.4 Grupos controle e referências de comparação

Para contextualizar os resultados dos tratamentos, foram analisados sete grupos controle, cujos dados serviram como referência de comparação: (i) controle negativo (C−, tratamento com etanol absoluto), representando o estado de dano à membrana celular de todas as células e utilizado como referência universal; (ii) controles positivos de cada grupo fenotípico (C+ VSE e C+ VRE), representando biofilmes não tratados com máxima viabilidade; e (iii) controles de solvente (DMSO MIC VSE, DMSO MIC VRE, 2× MIC DMSO VSE e 2× MIC DMSO VRE), preparados com o dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado como carreador da oleorresina nas mesmas concentrações empregadas nos tratamentos, para verificar se o solvente isolado compromete a viabilidade do biofilme. A comparação dos grupos tratados com a oleorresina foi realizada sempre em relação ao respectivo controle de DMSO da mesma concentração e do mesmo grupo fenotípico, isolando o efeito do composto em estudo do efeito do solvente carreador.

4.7.4.5 Análise estatística dos grupos

Cada grupo de tratamento foi analisado com base em 6 imagens de campos distintos (duplicatas), e os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP). Em razão do número reduzido de réplicas por grupo, inerente ao custo e à complexidade da aquisição em microscopia confocal de alta resolução, os dados são interpretados como descritivos e semi-quantitativos. Análises estatísticas formais de significância não foram aplicadas, e os resultados devem ser lidos em conjunto com os demais dados microbiológicos quantitativos obtidos neste estudo (determinação da

MIC) para uma interpretação integrada do efeito da oleorresina de copaíba sobre os biofilmes de E. faecalis VSE e VRE.

Na seção de resultados correspondente (seção 5.7), os dados são apresentados por grupo de tratamento, com a média e o desvio padrão das réplicas para cada métrica calculada. A razão IP/FDA é o parâmetro prioritário para interpretação do efeito da oleorresina sobre a integridade da membrana bacteriana no biofilme: razões próximas de zero indicam biofilme com alta proporção de células vivas; razões próximas de 1,0 indicam equilíbrio entre células vivas e mortas; e razões superiores a 1,0 indicam que as células com membrana comprometida predominam, evidência de morte celular predominante no biofilme tratado.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização química da oleorresina de *Copaifera officinalis*

A oleorresina utilizada no presente estudo (lote 010, Plumerya® Óleos Essenciais) foi identificada botanicamente como *C. officinalis*, obtida por extração a trado do tronco da planta, com origem no Brasil.

A análise da fração volátil, realizada por cromatografia gasosa de alta resolução com detector de ionização em chama (CG-FID), revelou predominância de sesquiterpenos hidrocarbonados. O *β*-cariofileno foi o composto majoritário (69,5%), seguido por *α*-humuleno (11,1%), *α*-copaeno (5,0%), germacreno-D (3,1%), *δ*-cadineno (1,5%), aromadendreno (1,6%), *β*-elemeno (1,3%), *α*-cubebeno (0,8%), *δ*-elemeno (0,4%) e demais compostos (8,2%), conforme apresentado na Figura 11.

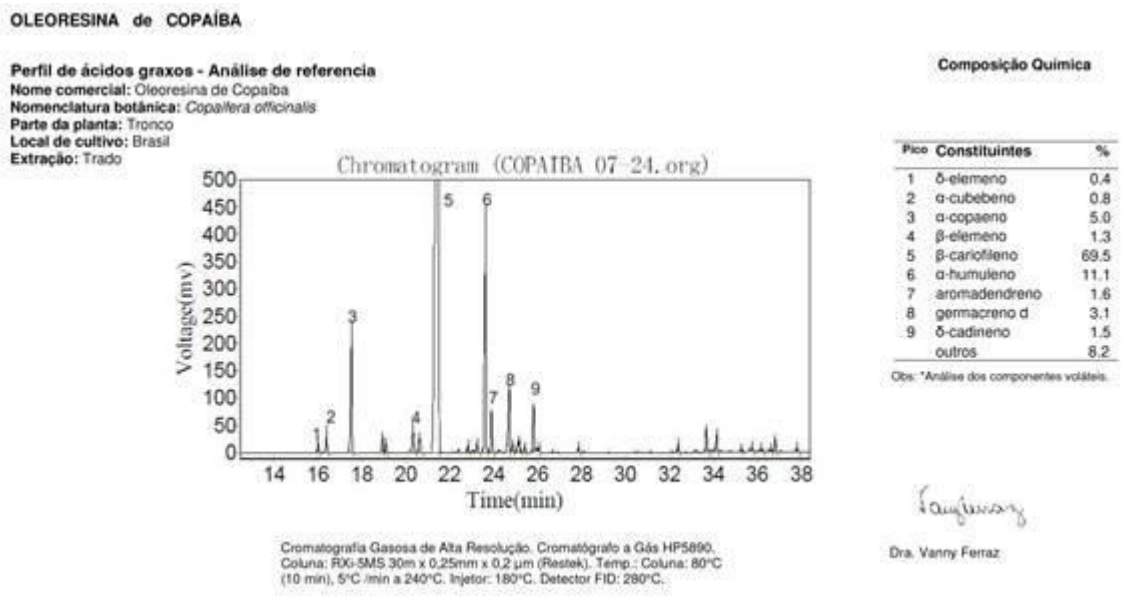


Figura 11. Certificado de análise cromatográfica (CG-FID) da oleorresina de *Copaifera officinalis*, lote 010 (Plumerya® Óleos Essenciais). À esquerda, informações de identificação botânica e método de extração. Ao centro, cromatograma com os picos numerados. À direita, tabela de composição química da fração volátil e assinatura da responsável técnica. **Fonte:** Plumerya® Óleos Essenciais, s.d.

5.2 Origem clínica e identificação dos isolados por MALDI-TOF

A identificação em nível de espécie dos isolados selecionadao foi realizada por MALDI-TOF, utilizando equipamento *Microflex LT* (*Bruker Daltonics*, Bremen, Alemanha). Todos os oito isolados incluídos no estudo apresentaram identificação confiável como *Enterococcus faecalis*, com escores variando de 2,273 a 2,466, todos acima do limiar de 2,0 estabelecido pelo fabricante como critério de identificação segura em nível de espécie (Tabela 4).

Os isolados posteriormente classificadas como VSE (n = 4) e VRE (n = 4) foram selecionados com base no perfil de susceptibilidade à vancomicina, determinado por antibiograma conforme descrito na seção 4.2.1.

Tabela 4. Resultado da identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF (*Microflex LT*, *Bruker Daltonics*, Bremen, Alemanha) dos isolados de *Enterococcus faecalis* incluídos no estudo.

Cepa	Identificação	Escore
485	***Enterococcus faecalis***	**2,460**
586	***Enterococcus faecalis***	**2,290**
633	***Enterococcus faecalis***	**2,466**
1220	***Enterococcus faecalis***	**2,435**
1854	***Enterococcus faecalis***	**2,273**
1950	***Enterococcus faecalis***	**2,426**
2074	***Enterococcus faecalis***	**2,438**
2390	***Enterococcus faecalis***	**2,401**

5.3 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos oito isolados de *E. faecalis* foi determinado pelo método de difusão em disco, com interpretação conforme os pontos de corte do CLSI M100 (33ª ed., 2023) para *Enterococcus* spp. Os diâmetros médios

dos halos de inibição e as classificações correspondentes estão apresentados na Tabela 5.

As cepas 485, 586, 633 e 1220, classificadas como sensíveis à vancomicina (VSE), apresentaram sensibilidade à ampicilina, cloranfenicol, vancomicina, gentamicina, nitrofurantoína, estreptomicina, ciprofloxacino. Entretanto, resistência à tetraciclina foi observada nas cepas 485, 586 e 1220, e resistência à eritromicina nas cepas 485, 633 e 1220, indicando que o grupo VSE não apresenta perfil de susceptibilidade universal para todos os antimicrobianos testados.

As cepas 1854, 1950, 2074 e 2390, classificadas como resistentes à vancomicina (VRE), demonstraram perfil de multirresistência consistente, com resistência à vancomicina, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacino, e eritromicina em todas as quatro cepas, mantendo sensibilidade apenas à ampicilina, nitrofurantoína e estreptomicina.

O padrão observado evidencia diferença marcante entre os grupos, com as cepas VRE apresentando resistência homogênea a sete dos nove antimicrobianos testados, ao passo que as VSE exibem resistências pontuais e variáveis entre os isolados, particularmente para tetraciclina e eritromicina.

Tabela 5. Diâmetros médios dos halos de inibição (mm) obtidos pelo método de difusão em disco para os isolados VSE e VRE de *Enterococcus faecalis*, com classificação de susceptibilidade conforme CLSI M100 (33ª ed., 2023). Os valores correspondem à média dos ensaios realizados em triplicata.

Antibiótico	VSE				VRE			
	485	586	633	1220	1854	1950	2074	2390
Ampicilina (10 µg)	26 (S)	30 (S)	23 (S)	32 (S)	20 (S)	26 (S)	25 (S)	20 (S)
Cloranfenicol (30 µg)	16 (S)	22 (S)	22 (S)	15 (S)	10 (R)	10 (R)	13 (R)	12 (R)
Vancomicina (30 µg)	18 (S)	18 (S)	17 (S)	17 (S)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
Gentamicina (120 µg)	21 (S)	29 (S)	21 (S)	23 (S)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
Tetraciclina (30 µg)	7 (R)	6 (R)	19 (S)	10 (R)	7 (R)	8 (R)	9 (R)	9 (R)
Nitrofurantoína (300 µg)	22 (S)	27 (S)	22 (S)	23 (S)	20 (S)	19 (S)	23 (S)	22 (S)
Estreptomicina (300 µg)	17 (S)	19 (S)	20 (S)	22 (S)	12 (S)	18 (S)	20 (S)	18 (S)
Ciprofloxacino (5 µg)	24 (S)	23 (S)	27 (S)	26 (S)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
Eritromicina (15 µg)	15 (R)	30 (S)	18 (R)	18 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)

S = sensível; R = resistente.

5.4 Atividade antibacteriana da oleorresina de *Copaifera officinalis* por difusão em disco

A atividade antibacteriana da oleorresina de *Copaifera officinalis* foi avaliada por ensaio qualitativo de difusão em disco frente a quatro espécies Gram-positivas e três Gram-negativas. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Observou-se formação de halo de inibição do crescimento para todas as espécies Gram-positivas testadas: *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus* e *L. monocytogenes* (Figura 12). Para as espécies Gram-negativas, *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* e *E. coli* (Figura 13) — não foi observada formação de halo de inibição nas condições experimentais empregadas.

Tabela 6. Avaliação qualitativa da atividade antibacteriana da oleorresina de *C. officinalis* pelo método de difusão em disco frente a espécies Gram-positivas e Gram-negativas. Os valores correspondem à média dos ensaios realizados em triplicata independente. “Ausente” indica ausência de halo de inibição.

Espécie	Diâmetro do halo de inibição em mm
Enterococcus faecalis **ATCC 29212**	**50**
Bacillus cereus **ATCC 14579**	**12**
Staphylococcus aureus **ATCC 29231**	**48**
Listeria monocytogenes **ATCC 7644**	**8**
***Salmonella* spp.**	**Ausente**
Pseudomonas aeruginosa **ATCC 27853**	**Ausente**
Escherichia coli **INCQS 0031**	**Ausente**

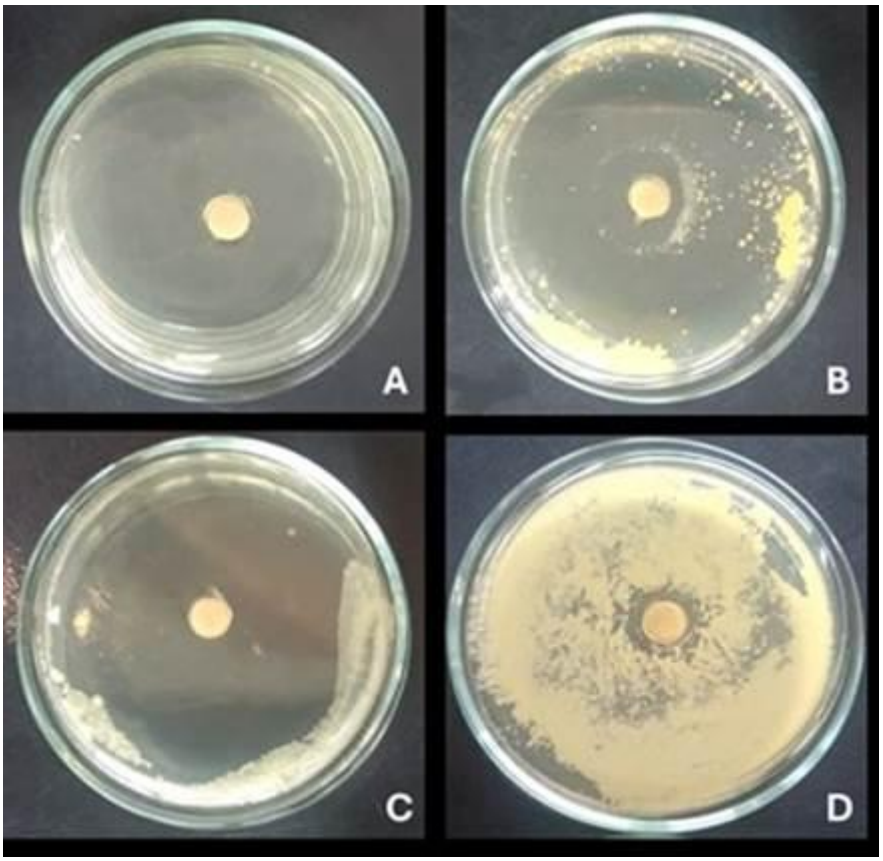


Figura 12. Registro fotográfico representativo do ensaio qualitativo de difusão em disco da oleorresina de *Copaifera officinalis* frente às espécies Gram-positivas. Observa-se formação de halo de inibição em **(A)** *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; **(B)** *Bacillus cereus* ATCC 14579; **(C)** *Staphylococcus aureus* ATCC 29231; e **(D)** *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

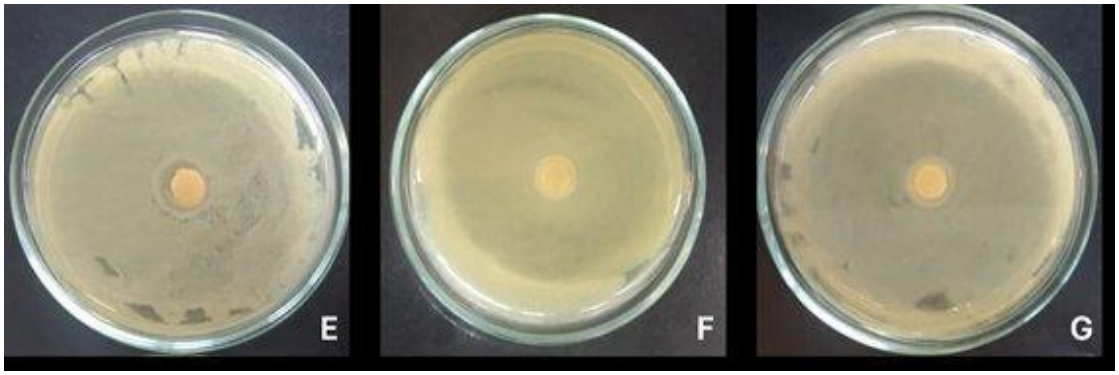


Figura 13. Registro fotográfico representativo do ensaio qualitativo de difusão em disco da oleorresina de *C. officinalis* frente às espécies Gram-negativas. Observa-se ausência de halo de inibição em **(E)** *Salmonella* spp.; **(F)** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; e **(G)** *Escherichia coli* INCQS 0031.

5.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM da oleorresina de *C. officinalis* frente aos isolados de *E. faecalis* foi determinada pelo método de microdiluição em MHB. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

As quatro cepas classificadas como VSE apresentaram CIM uniforme de 1,25% (v/v), enquanto as quatro cepas VRE apresentaram CIM uniforme de 2,5% (v/v). Os valores foram consistentes entre as três triplicatas realizadas em momentos experimentais distintos.

Tabela 7. Concentração inibitória mínima (CIM) da oleorresina de *C. officinalis* para os isolados VSE e VRE de *E. faecalis*, determinada por microdiluição em MHC. Os valores correspondem à média dos ensaios realizados em triplicata.

Cepa	Grupo	CIM (% v/v)
485	VSE	1,25
586	VSE	1,25
633	VSE	1,25
1220	VSE	1,25
1854	VRE	2,5
1950	VRE	2,5
2074	VRE	2,5
2390	VRE	2,5

5.5.1 Controle do solvente (DMSO)

O ensaio de controle do solvente demonstrou ausência de atividade inibitória do DMSO nas concentrações empregadas. Após subcultivo em MHA e incubação por 24h, observou-se crescimento bacteriano confluente em todas as concentrações de DMSO testadas, confirmando que o solvente não exerceu efeito antimicrobiano detectável nas condições experimentais. Esses resultados validam a atribuição da atividade inibitória observada nos ensaios de CIM à oleorresina de *C. officinalis* e não

ao DMSO utilizado como cossolvente (Figura 14).

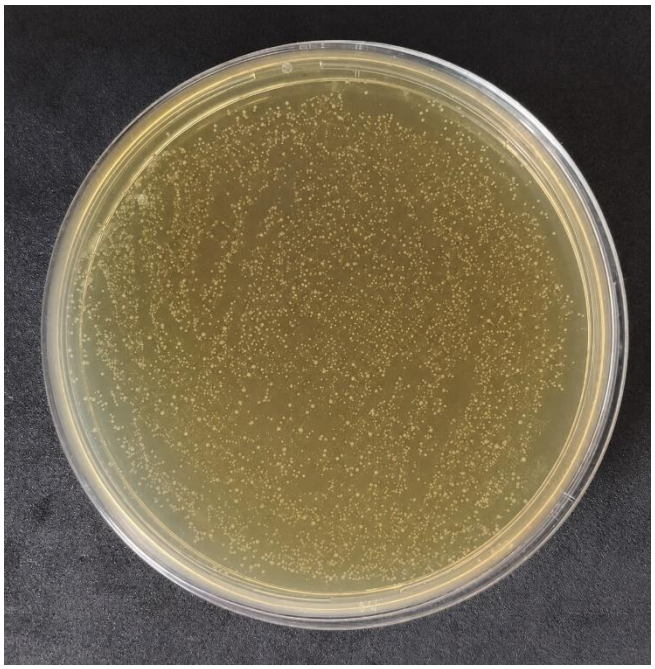


Figura 14. Cultura representativa do controle de solvente após 24h de incubação em MHA. Observa-se crescimento bacteriano confluente na presença de DMSO na máxima concentração utilizada para VRE (2,5%), confirmando ausência de atividade antimicrobiana do solvente nas condições experimentais empregadas.

5.5.2 Avaliação qualitativa do efeito bactericida

Após a determinação da CIM, o conteúdo dos poços de todas as concentrações testadas (5% a 0,15625%), bem como dos controles experimentais, foi recolhido com alça de platina e semeado por estriamento em MHA. Observou-se crescimento bacteriano em todas as concentrações avaliadas, inclusive na concentração de 5% (v/v), correspondente a 2× CIM para as cepas VRE e 4× CIM para as VSE nas condições testadas. Esses resultados são sugestivos de efeito predominantemente bacteriostático da oleorresina nas condições experimentais empregadas, uma vez que a inibição do crescimento não foi acompanhada de atividade bactericida detectável por subcultivo. Os registros fotográficos representativos estão apresentados nas Figuras 15 e 16.

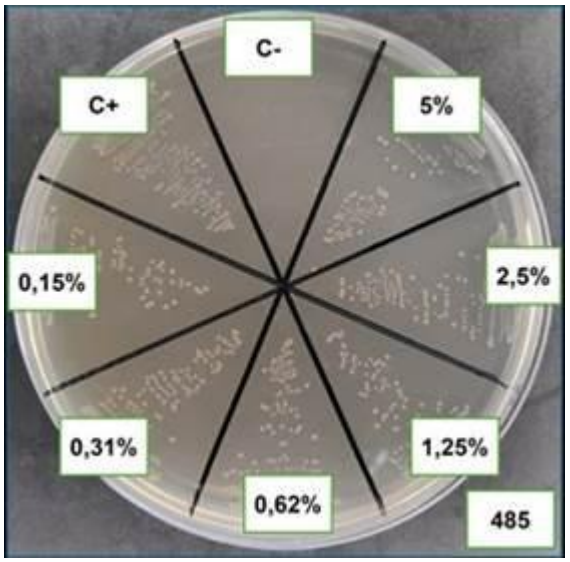


Figura 15. Cultura represntativa dos VSE após ensaio de CIM. Observa-se crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas (5% a 0,15%), além do controle positivo (C+). O controle negativo (C−) não apresentou crescimento, confirmando a esterilidade do meio. Os resultados são sugestivos de ausência de efeito bactericida nas condições avaliadas.

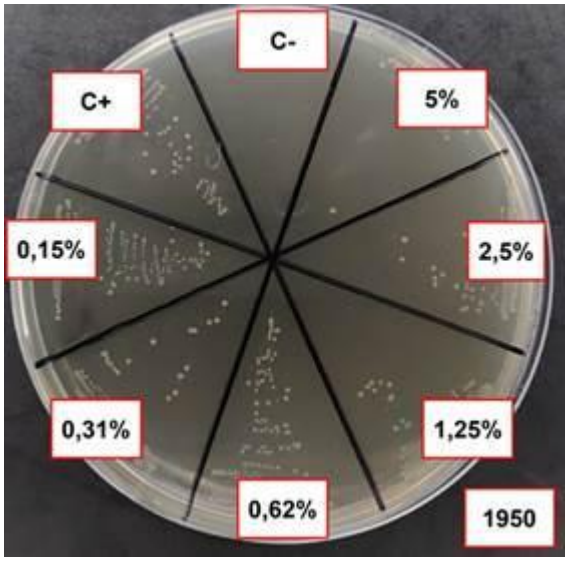


Figura 16. Cultura representativa dos VRE após ensaio de CIM. Observa-se crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas (5% a 0,15%), além do controle positivo (C+). O controle negativo (C−) não apresentou crescimento, confirmando a esterilidade do meio. Os resultados são sugestivos de efeito predominantemente bacteriostático da oleorresina nas condições avaliadas.

5.6 Avaliação do sinergismo e antagonismo entre a oleorresina de *Copaifera officinalis* e antibióticos convencionais

O teste de dupla difusão em disco revelou padrões distintos de interação entre a oleorresina de *C. officinalis* e os antimicrobianos testados, com variação tanto

entre as cepas VSE e VRE quanto entre os antibióticos (Tabelas 8 e 9).

Nas cepas VSE (485, 586, 633 e 1220), o ensaio de interação foi realizado utilizando os antibióticos em associação com a oleorresina na CIM de 1,25%. Os resultados demonstraram 12 interações sinérgicas e 24 antagônicas. O antagonismo predominou nas combinações com ampicilina, eritromicina, estreptomicina e nitrofurantoína, com reduções médias dos halos dos antibióticos frequentemente superiores a 5 mm. O isolado 633 destacou-se como exceção, apresentando sinergismo com cinco dos nove antimicrobianos testados, incluindo ciprofloxacino (Δ +5,5 mm) e tetraciclina (Δ +6,5 mm) (Tabela 8).

Nas cepas VRE (1854, 1950, 2074 e 2390), o ensaio foi realizado com a oleorresina na CIM de 2,5%. Dos 36 pares avaliados, foram identificadas três interações sinérgicas, 13 antagônicas e 20 neutras. O sinergismo foi pontual e isolado: ampicilina frente ao isolado 1854 (Δ +3,0 mm), eritromicina frente ao isolado 1950 (Δ +4,5 mm) e nitrofurantoína frente ao isolado 2390. O antagonismo predominou nas combinações com nitrofurantoína, cloranfenicol e tetraciclina, com reduções de até 6,5 mm. Em conjunto, os resultados não evidenciaram efeito potencializador consistente da oleorresina sobre os antibióticos convencionais testados (Tabela 9).

Tabela 8. Classificação das interações entre oleorresina de *C. officinalis* e antibióticos nos isolados VSE

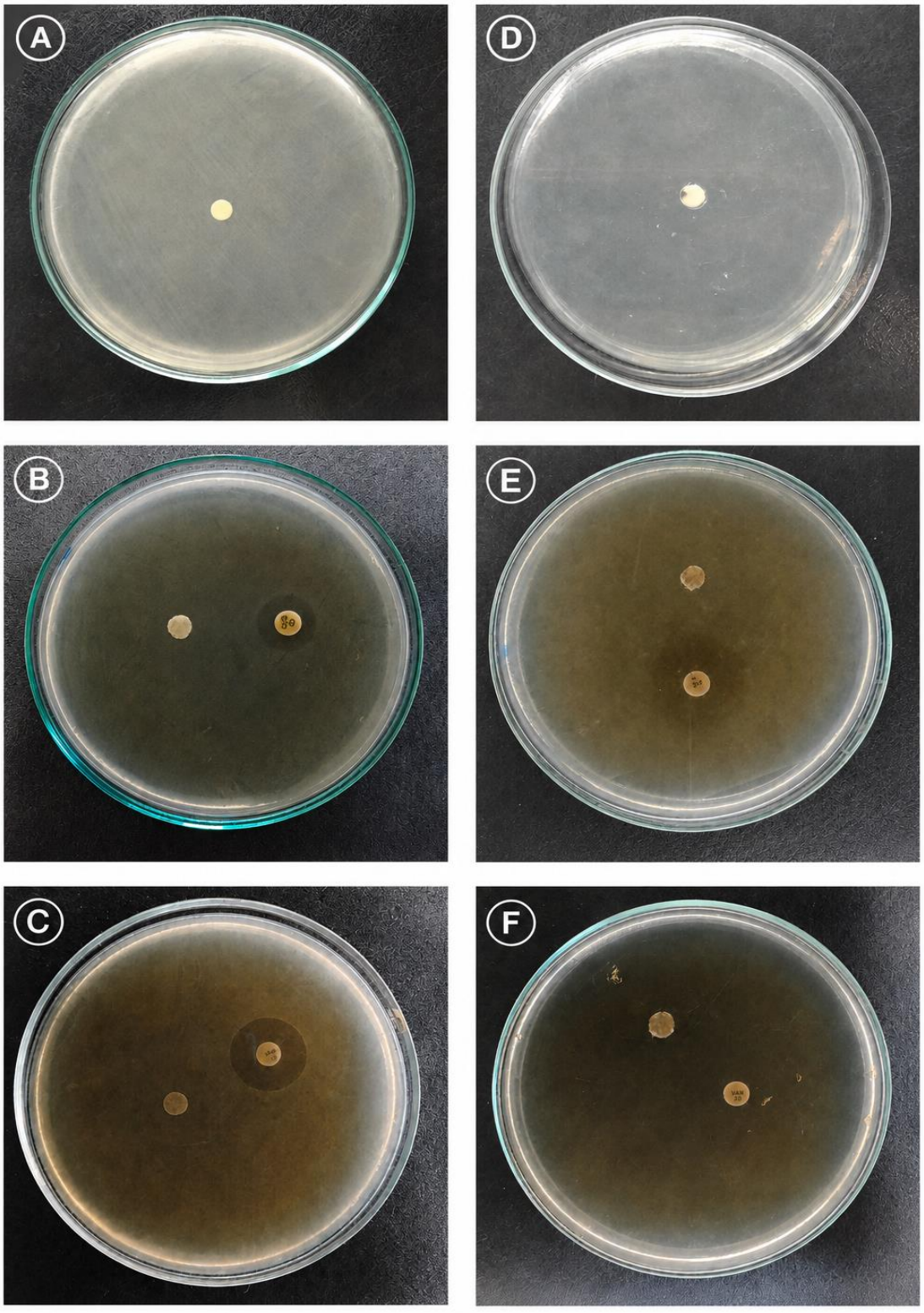
Antibiótico	485	586	633	1220
Ampicilina	Ant	Ant	Sin	Ant
Ciprofloxacino	Sin	Ant	Sin	Ant
Cloranfenicol	Sin	Ant	Sin	Sin
Eritromicina	Ant	Sin	Ant	Ant
Estreptomicina	Ant	Ant	Ant	Sin
Gentamicina	Ant	Sin	Ant	Ant
Nitrofurantoína	Ant	Ant	Sin	Ant
Tetraciclina	Ant	Ant	Sin	Sin
Vancomicina	Ant	Ant	Sin	Ant

Sin = sinérgico; Ant = antagonista; Neu = neutro

Tabela 9. Classificação das interações entre oleorresina de *C. officinalis* e antibióticos nos isolados VRE

Antibiótico	1854	1950	2074	2390
Ampicilina	Sin	Ant	Ant	Ant
Ciprofloxacino	Neu	Neu	Neu	Neu
Cloranfenicol	Neu	Ant	Neu	Ant
Eritromicina	Neu	Sin	Neu	Neu
Estreptomicina	Neu	Ant	Ant	Neu
Gentamicina	Neu	Neu	Neu	Neu
Nitrofurantoína	Ant	Ant	Ant	Sin
Tetraciclina	Neu	Ant	Ant	Ant
Vancomicina	Neu	Neu	Neu	Neu

Sin = sinérgico; Ant = antagonista; Neu = neutro



.

Figura 17. Representação dos resultados do teste de sinergismo e antagonismo por difusão em disco da oleorresina de copaíba e de antibióticos convencionais frente a cepas de *E. faecalis* VSE e VRE. Os painéis A–C correspondem à cepa 586 (VSE). Em **(A)**, observa-se ausência de halo de inibição ao redor do disco de papel impregnado com a concentração inibitória mínima (CIM) da oleorresina. Em **(B)**, observa-se ausência de halo ao redor do disco contendo a CIM da oleorresina, enquanto o disco de

cloranfenicol (CLO 30) apresenta halo de inibição. Em **(C)**, observa-se ausência de halo ao redor do disco contendo a CIM da oleorresina e presença de halo de inibição ao redor do disco de vancomicina (VAN 30). Os painéis D–F correspondem à cepa 2074 (VRE). Em **(D)**, observa-se ausência de halo de inibição ao redor do disco impregnado com a CIM da oleorresina. Em **(E)**, observa-se ausência de halo ao redor do disco contendo a CIM da oleorresina e presença de halo de inibição ao redor do disco de estreptomicina (EST), antibiótico ao qual a cepa se mostrou sensível. Em **(F)**, observa-se ausência de halo tanto ao redor do disco contendo a CIM da oleorresina quanto ao redor do disco de vancomicina (VAN 30), compatível com o perfil resistente da cepa VRE.

5.7 Avaliação da integridade da membrana bacteriana por microscopía confocal de varredura a laser

Para investigar se a oleorresina de copaíba é capaz de comprometer a integridade celular das bactérias dentro do biofilme, foi utilizada a microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) com marcação simultânea por diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP). O FDA gera sinal verde apenas em células com metabolismo ativo: suas enzimas intracelulares convertem o corante em um produto fluorescente que não se forma em células inativas ou mortas. O IP, por sua vez, produz sinal vermelho somente quando a membrana plasmática está rompida ou gravemente danificada, impedindo que o corante entre em células íntegras. A interpretação visual é direta: imagens predominantemente verdes correspondem a biofilmes com células vivas predominando; imagens predominantemente vermelhas indicam que as células com membrana comprometida são a maioria.

A quantificação foi realizada pela razão entre as intensidades médias de fluorescência dos dois canais (razão IP/FDA). Razões abaixo de 1,0 indicam predomínio de células vivas; razões acima de 1,0, denominadas inversão, indicam que as células com membrana comprometida superam as metabolicamente ativas no campo analisado. Esse limiar de 1,0 é o parâmetro central de interpretação dos resultados desta seção. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de seis imagens de campos independentes por grupo de tratamento.

5.7.1 Validação dos controles experimentais

Os grupos controle confirmaram a validade técnica da metodologia, conforme ilustrado na Figura 18. O controle negativo de morte, preparado com etanol

absoluto, apresentou ausência quase total de sinal verde (FDA = 0,02 ± 0,02 UA) e fluorescência vermelha intensa (IP = 407,5 ± 138,7 UA), confirmando a morte celular total esperada para esse agente. Os controles positivos de biofilme viável das cepas VSE (C+ VSE) e VRE (C+ VRE) mantidos sem qualquer tratamento exibiram razões IP/FDA de 0,033 e 0,078, respectivamente, com predomínio inequívoco de sinal verde, caracterizando biofilmes íntegros. Os controles de solvente (DMSO), avaliados nas concentrações equivalentes às utilizadas nos tratamentos, mantiveram razões IP/FDA inferiores a 0,24 em todas as condições testadas para ambos os grupos. Esse resultado confirma que o solvente, por si só, não causa morte celular relevante, validando que os efeitos observados nos grupos tratados com oleorresina são atribuíveis ao composto estudado.

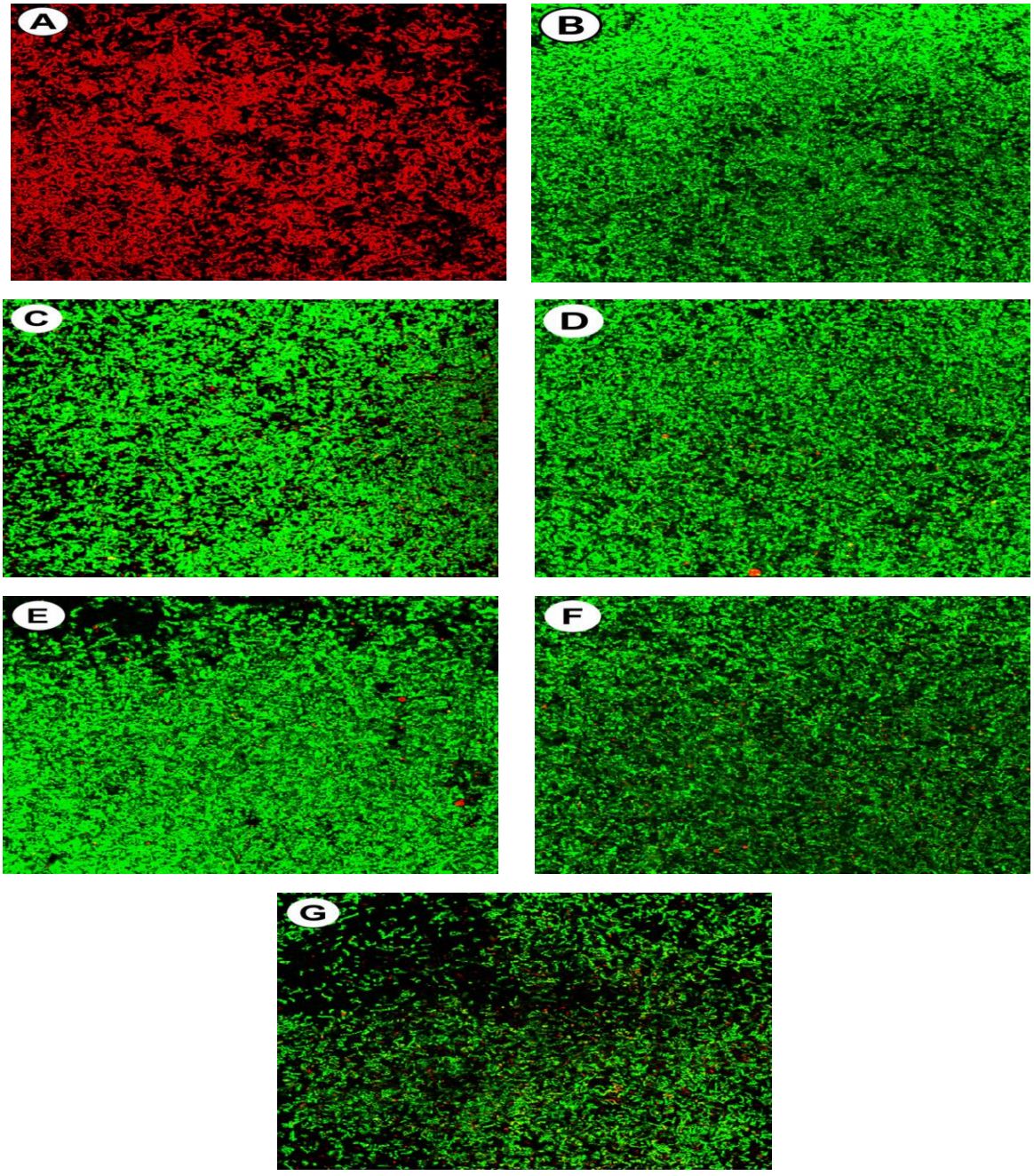


Figura 18. Imagens representativas de microscopia confocal de varredura a laser dos grupos controle. **(verde):** fluorescência FDA, indicativa de células metabolicamente ativas. **(vermelho):** fluorescência IP, indicativa de células com membrana comprometida. **(A)** C−: sinal verde ausente e vermelho intenso, confirmando morte total por etanol. **(B)** C+ VSE, **(C)** C+ VRE: sinal verde predominante, confirmando biofilme viável. **(D)** Controle de DMSO CIM VSE, **(E)** Controle de DMSO CIM VRE, **(F)** Controle de DMSO 2× CIM VSE e **(G)** Controle de DMSO 2× CIM VRE: sinal verde mantido, confirmando que o solvente não compromete a viabilidade. Aquisição: microscópio confocal Olympus FV1000, objetiva UPLSAPO 60× S (NA 1,30); lasers 473 nm (FDA) e 559 nm (IP); primeiros 20 cortes do eixo Z.

5.7.2 Efeito da oleorresina de copaíba sobre a integridade de membrana nos biofilmes de *E. faecalis*

Os resultados das oito cepas clínicas (quatro VSE e quatro VRE) são apresentados na Tabela 10 e ilustrados nas Figuras 19 e 20. A Figura 21 compara graficamente as razões IP/FDA entre todos os isolados e concentrações.

Na concentração da CIM, nenhuma cepa atingiu a inversão da razão IP/FDA. Nas cepas VSE, as razões variaram de 0,130 a 0,528, com redução da fluorescência verde de 6% a 60% em relação ao respectivo controle de solvente, indicando enfraquecimento do biofilme sem que as células com membrana comprometida se tornassem predominantes. Nas cepas VRE, as razões na CIM foram igualmente inferiores a 1,0 (0,138–0,166), porém o sinal de IP foi expressivamente mais elevado do que no controle de DMSO, entre 39,8 e 68,8 UA contra 3,5 ± 0,4 UA no controle, evidenciando dano real à membrana bacteriana mesmo na ausência de inversão. Assim, embora a CIM não tenha sido suficiente para que as células mortas predominassem em nenhum isolado, ela produziu comprometimento detectável de membrana em ambos os grupos.

Na concentração de 2× CIM, o efeito foi substancialmente mais intenso e se diferenciou entre as cepas VSE e VRE (Figuras 19 e 20). Entre as cepas VSE, três (485, 586 e 1220) atingiram inversão da razão IP/FDA, com valores médios de 5,49, 2,43 e 7,61, respectivamente, e reduções de fluorescência verde superiores a 83%. A cepa 633 situou-se em condição intermediária: razão de 0,863 com redução de 60,6% do sinal verde, indicando comprometimento expressivo sem que a morte celular predominante fosse confirmada.

Entre as cepas VRE, todos apresentaram reduções de FDA entre 75% e 84% em relação ao controle de solvente, efeito de magnitude comparável ao observado nas VSE, porém a inversão da razão IP/FDA foi confirmada de forma plena apenas a cepa 2074 (razão = 1,180 ± 0,723), e com ressalva: apenas uma das duas duplicatas apresentou inversão individual, sendo o resultado classificado como parcial. As três cepas VRE restantes mantiveram razões entre 0,451 e 0,715, indicando forte redução de biomassa viável sem que o limiar de inversão fosse atingido.

Tabela 10. Razão IP/FDA e redução de biomassa viável nas cepas VSE e VRE submetidas ao tratamento com CIM e 2× CIM da oleorresina de copaíba.

Cepa	Fenótipo	Razão IP/FDA na CIM	Razão IP/FDA na 2× CIM	Red. FDA 2× CIM (%)	Resultado na 2× CIM
485	VSE	0,429 ± 0,569	**5,493 ± 6,234**	−83,2	↑ **Inversão**
586	VSE	0,528 ± 0,620	**2,433 ± 2,364**	−91,2	↑ **Inversão**
633	VSE	0,130 ± 0,060	0,863 ± 0,145	−60,6	Sem inversão
1220	VSE	0,180 ± 0,097	**7,612 ± 3,237**	−96,5	↑ **Inversão**
1854	VRE	0,150 ± 0,085	0,715 ± 0,066	−82,8	Sem inversão
1950	VRE	0,166 ± 0,072	0,493 ± 0,379	−83,6	Sem inversão
2074	VRE	0,138 ± 0,054	**1,180 ± 0,723**	−75,2	**↑† Inversão parc.**
2390	VRE	0,151 ± 0,084	0,451 ± 0,038	−76,2	Sem inversão

Valores expressos como média ± DP. ↑ = inversão da razão IP/FDA (> 1,0; morte celular predominante). † = inversão observada em apenas uma das duas duplicatas. Negrito: razão IP/FDA > 1,0. Red. FDA = redução percentual da intensidade de fluorescência FDA em relação ao respectivo controle de DMSO (DMSO 2× CIM VSE ou DMSO 2× CIM VRE, conforme o grupo). UA = unidades arbitrárias.

A oleorresina de copaíba demonstrou atividade dose-dependente sobre a integridade de membrana em biofilmes de todos os isolados testados. A diferença entre os grupos VSE e VRE não foi de ausência ou presença de efeito, mas de intensidade: na concentração de 2× CIM, três dos quatro isolados VSE atingiram inversão da razão IP/FDA, indicando predomínio de células com membrana comprometida; nos isolados VRE, a mesma concentração promoveu reduções expressivas de fluorescência FDA, sem que a inversão fosse confirmada na maioria dos casos. Esses achados indicam resposta distinta entre os fenótipos frente à oleorresina nas condições testadas.

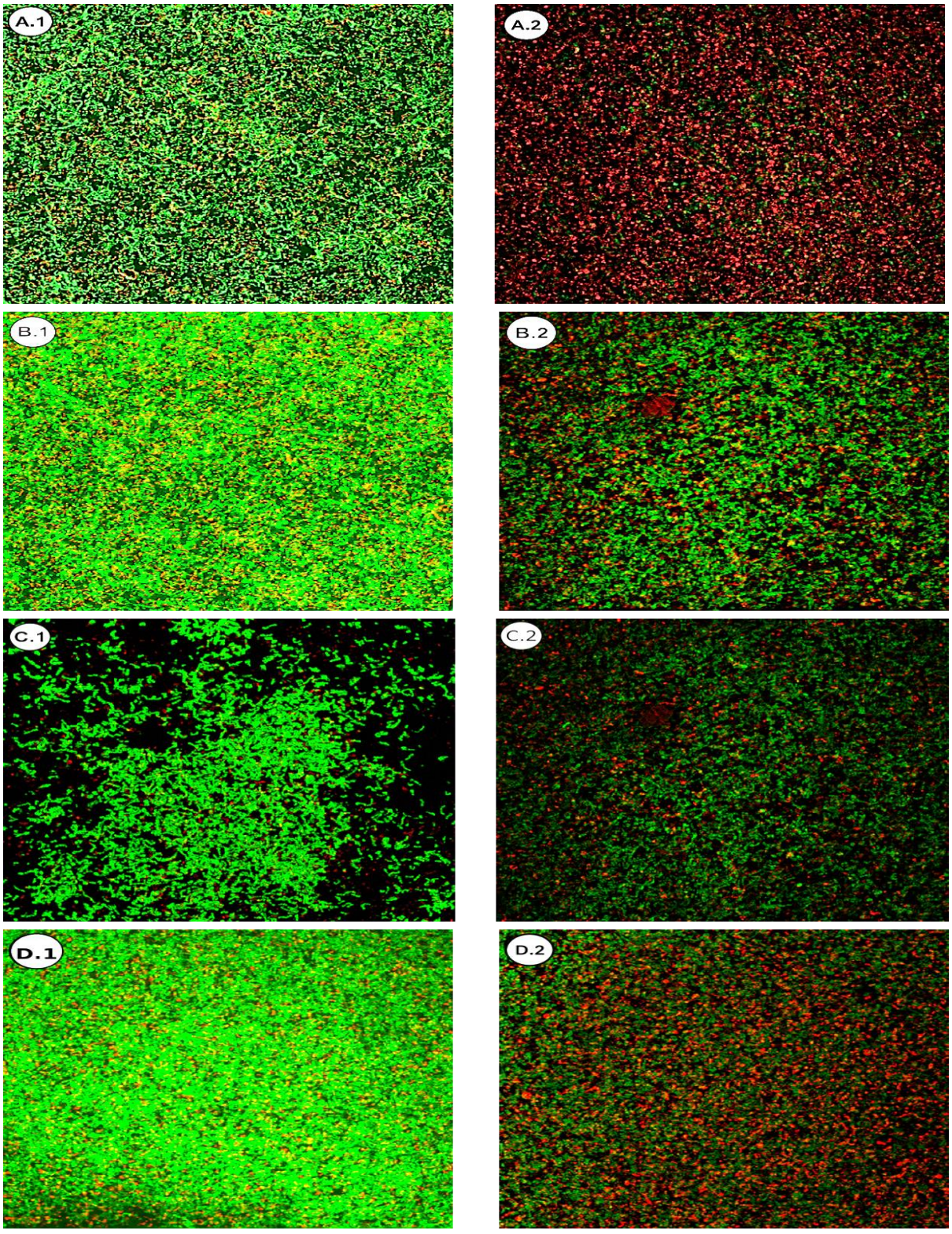


Figura 19. Imagens representativas das cepas VSE **(A)** 485, **(B)** 586, **(C)** 633 e **(D)** 1220 submetidos ao tratamento com a CIM e com o dobro dessa concentração (2× CIM) da oleorresina de copaíba. Em cada isolado, a identificação **.1** indica a imagem referente ao tratamento com CIM, enquanto a identificação **.2** indica a imagem referente ao tratamento com 2× CIM. As imagens confocais foram obtidas com marcação por FDA (verde) e iodeto de propídio – IP (vermelho).

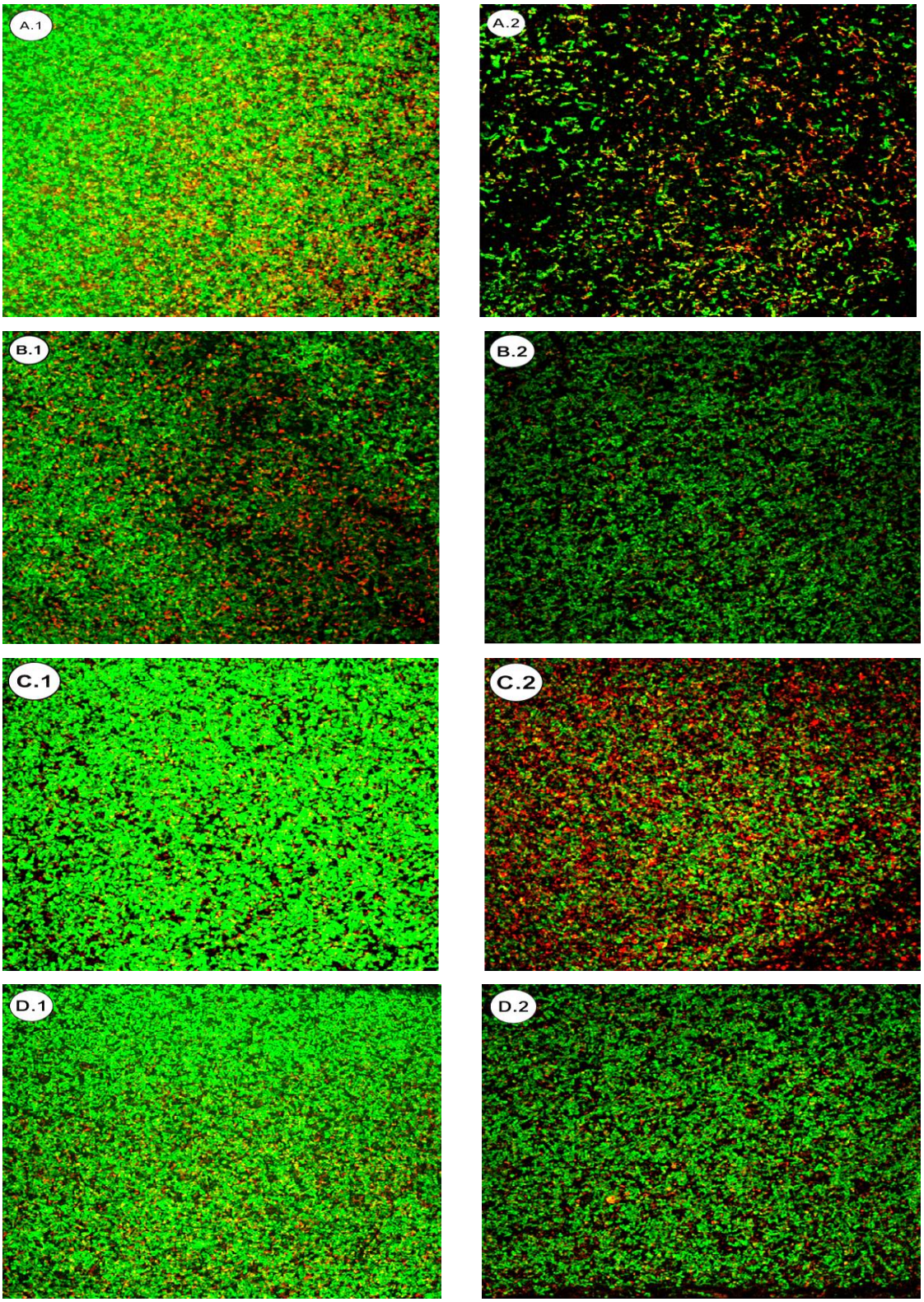


Figura 20. Imagens representativas das cepas VRE **(A)** 1854, **(B)** 1950, **(C)** 2074 e **(D)** 2390 submetidos ao tratamento com a CIM e com o dobro dessa concentração (2× CIM) da oleorresina de copaíba. Em cada isolado, a identificação **.1** indica a imagem referente ao tratamento com CIM, enquanto a identificação **.2** indica a imagem referente ao tratamento com 2× CIM. As imagens confocais foram obtidas com marcação por FDA (verde) e iodeto de propídio – IP (vermelho).

5.7.3 Análise comparativa entre isolados VSE e VRE

A comparação entre as cepas VSE e VRE revela um padrão diferenciado de resposta à oleorresina de copaíba, apresentado na Figura 21. Entre as cepas VSE, três das quatro cepas testadas apresentaram inversão da razão IP/FDA na 2× CIM, indicando morte celular predominante. Entre as cepas VRE, nenhum isolado apresentou inversão consistente da razão IP/FDA; apenas a cepa 2074 exibiu inversão parcial, confirmada em somente uma das réplicas.

As reconstruções tridimensionais representativas dos biofilmes, apresentadas na Figura 22 , oferecem uma perspectiva visual e espacial complementar à análise quantitativa das razões IP/FDA (painéis A–K). No controle negativo de morte (C-) , a ausência de fluorescência verde e a intensidade do sinal vermelho ao longo de toda a espessura do biofilme confirmam a morte celular total induzida pelo controle positivo de morte (Figura 22A). Os controles de biofilme viável não tratado (C+ VSE e C+ VRE) exibem sinal verde uniformemente distribuído, indicando integridade de membrana preservada em ambos os grupos (Figura 22B e 22C). Os controles de solvente DMSO, tanto na CIM quanto para 2× CIM para as cepas VSE e VRE mantiveram o sinal verde predominante em toda a extensão do biofilme, validando o DMSO como veículo inerte nas concentrações utilizadas (Figuras 22D a 22G).

Nos tratamentos com oleorresina, o padrão de fluorescência difere entre grupos e concentrações. No tratamento com a CIM para VSE, observa-se aumento do sinal vermelho de IP e redução da fluorescência verde em comparação aos controles, sugerindo comprometimento de membrana e redução da atividade metabólica no biofilme (Figura 22H). Contudo, esse padrão visual não correspondeu à inversão quantitativa da razão IP/FDA, uma vez que todas as cepas VSE permaneceram com razão inferior a 1,0 nessa concentração. Portanto, a CIM deve ser interpretada como promotora de dano detectável, mas não de morte celular predominante.

Em contraste, o biofilme das cepas VRE tratado com a CIM exibiu padrão misto, com presença de sinal vermelho associado à persistência de focos de fluorescência verde ao longo da estrutura, indicando manutenção de células metabolicamente ativas com membrana preservada (Figura 22I). Assim, na CIM, tanto para VSE quanto VRE apresentaram alterações compatíveis com dano celular, mas sem predominância quantitativa de células com marcação vermelha por iodeto de propídio. A distinção entre os grupos tornou-se mais evidente apenas na concentração

de 2× CIM, na qual a inversão da razão IP/FDA foi observada na maioria das cepas VSE, mas não de forma consistente nas cepas VRE.

Na concentração de 2× CIM, o sinal vermelho predomina nas reconstruções de ambas as cepas. Nas cepas VSE, a fluorescência verde está reduzida a focos escassos, confirmando o comprometimento de membrana na ampla maioria das células (Figura 22J). Nas cepas VRE , o sinal vermelho também domina, porém focos de fluorescência verde são observados com maior frequência em comparação ao painel J, refletindo a persistência de uma fração de células com membrana íntegra mesmo em concentrações suprainibitórias (Figura 22K). Esse contraste entre as imagens J e K é consistente com o padrão quantitativo, no qual as cepas VSE apresentaram razões IP/FDA superiores às das VRE na 2× CIM.

As alturas dos biofilmes visíveis no eixo Y das reconstruções (em nanômetros) apresentam variação expressiva entre condições e entre isolados, não devendo ser interpretadas como indicativo de eficácia antimicrobiana da oleorresina, dado que essa variabilidade é intrínseca ao crescimento de biofilme *in vitro*.

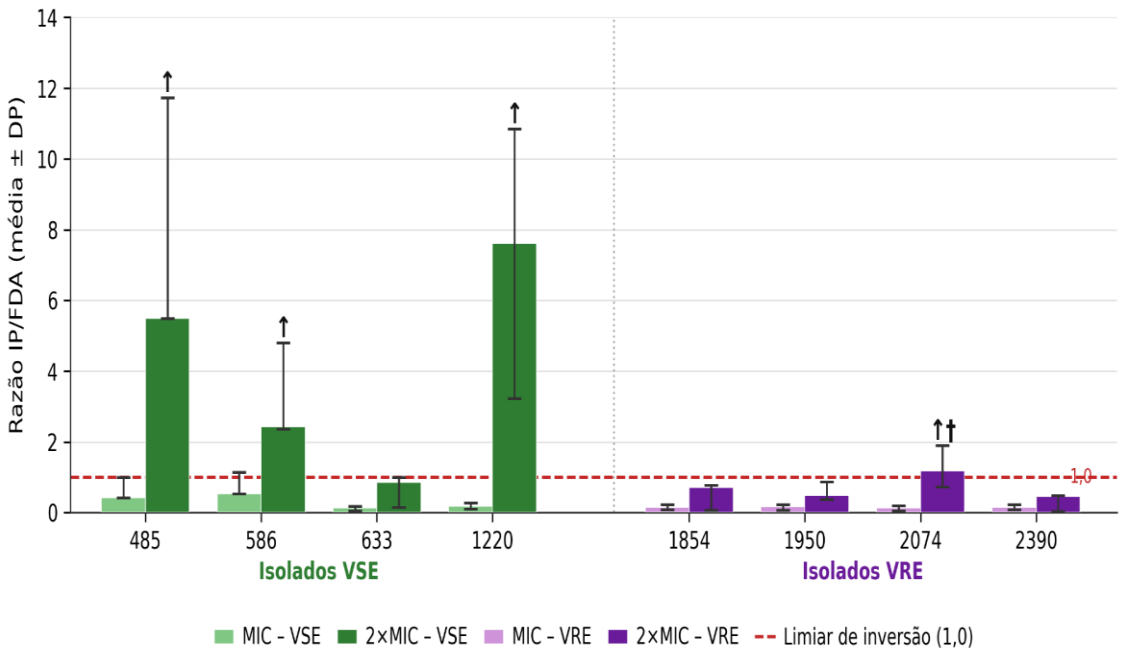


Figura 21. Análise comparativa da razão IP/FDA na CIM e na 2× CIM entre todas as cepas VSE e VRE. Barras em tons de verde: cepas VSE; barras em tons de roxo: cepas VRE. Tons claros: CIM; tons escuros: 2× CIM. Linha tracejada vermelha: limiar de inversão (razão = 1,0). Valores acima da linha indicam morte celular predominante na análise de fluorescência.

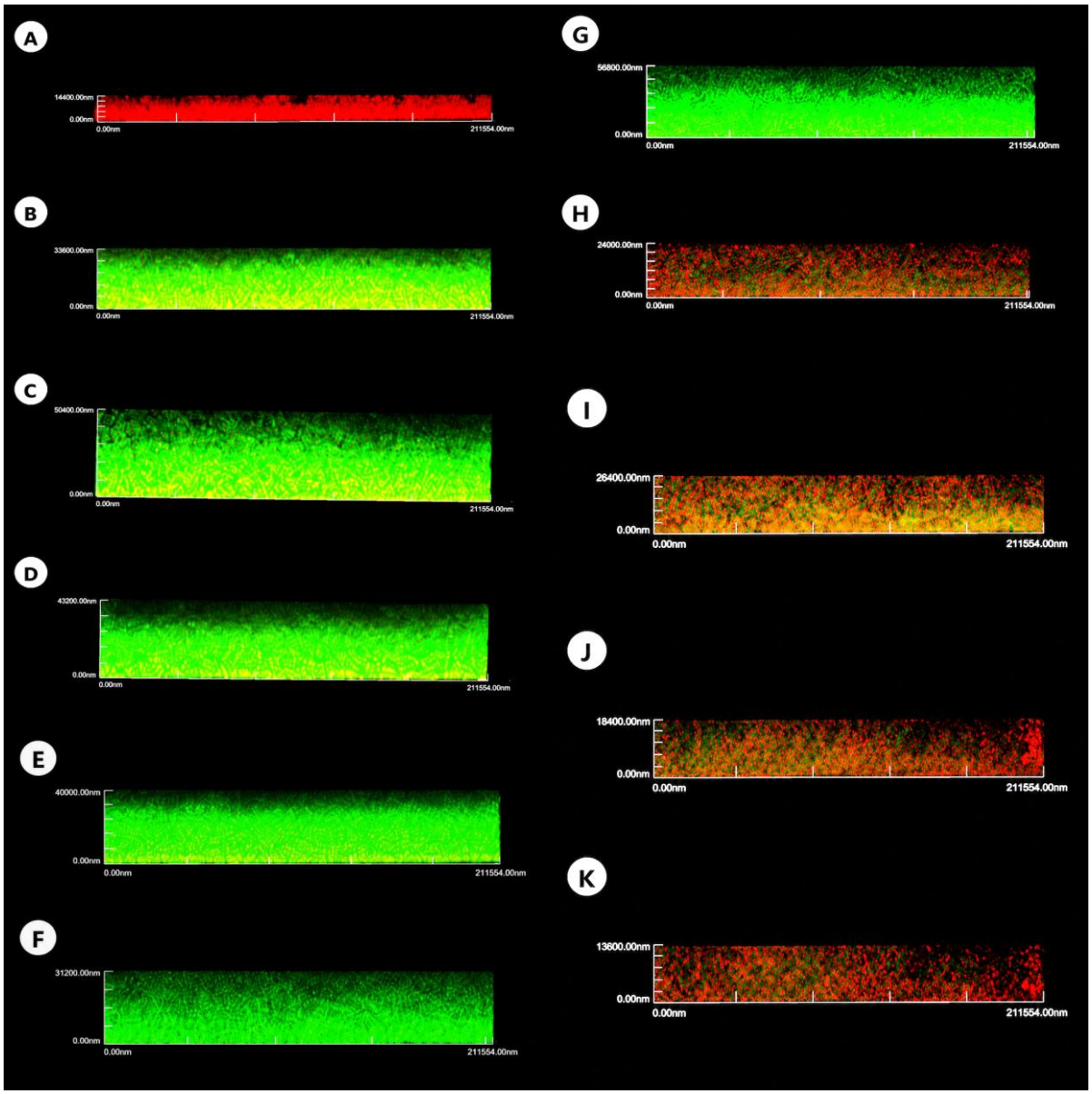


Figura 22. Reconstruções tridimensionais representativas de biofilmes de *Enterococcus faecalis* marcados com diacetato de fluoresceína (FDA; verde) e iodeto de propídio (IP; vermelho), obtidas por microscopia confocal de varredura a laser. O FDA indica células metabolicamente ativas com membrana preservada, enquanto o IP indica células com membrana comprometida. **(A)** C−, controle de morte por etanol, com fluorescência vermelha predominante. **(B)** C+ VSE e **(C)** C+ VRE, controles não tratados, com predomínio de fluorescência verde. **(D–G)** Controles DMSO nas concentrações equivalentes à CIM e 2× CIM para VSE e VRE, com manutenção do sinal verde, indicando ausência de efeito relevante do solvente sobre a viabilidade celular. **(H)** CIM VSE e **(I)** CIM VRE apresentam padrão misto, com aumento do sinal vermelho e persistência de áreas verdes, sugerindo dano de membrana parcial e manutenção de subpopulações viáveis. **(J)** 2× CIM VSE e **(K)** 2× CIM VRE exibem predomínio de sinal vermelho, compatível com maior comprometimento de membrana, embora ainda haja focos residuais de fluorescência verde, especialmente em VRE. As imagens são representativas de um isolado de cada grupo e condição de tratamento.

6 DISCUSSÃO

6.1 Composição química da oleorresina de *Copaifera officinalis*

A oleorresina de *C. officinalis* constitui uma matriz química complexa, formada por uma fração volátil rica em sesquiterpenos e por uma fração não volátil composta principalmente por diterpenos ácidos, distinção relevante em relação aos óleos essenciais, que correspondem predominantemente à fração volátil obtida por destilação, e que impede que a oleorresina seja interpretada como substância única ou equivalente direto de um óleo essencial, exigindo cautela na relação entre composição química e atividade biológica. Entre os constituintes frequentemente descritos para o gênero estão sesquiterpenos como *β*-cariofileno, *α*-copaeno, *β*-elemeno, *α*-humuleno e germacreno-D, além de diterpenos como ácido copálico, ácido caurenoico, ácido hardwíckico, ácido alepterólico e ácido polilático (da Trindade et al., 2018).

No presente estudo, a oleorresina foi adquirida em lote único acompanhado de laudo cromatográfico individualizado; a análise da fração volátil por CG-FID demonstrou predomínio de *β*-cariofileno (69,5%), seguido por *α*-humuleno (11,1%), *α*-copaeno (5,0%), germacreno-D (3,1%) e outros compostos minoritários, perfil compatível com o descrito para oleorresinas de *Copaifera* spp. na literatura (Arruda et al., 2019). A utilização de lote único e quimicamente rastreável é, portanto, um requisito metodológico, não apenas uma informação descritiva: amostras autênticas e comerciais de oleorresina de copaíba podem apresentar variações expressivas na composição em função da espécie, origem geográfica, processamento, armazenamento e eventual adulteração comercial (Lee et al., 2023), e sem esse controle, diferenças de atividade antimicrobiana poderiam refletir variação composicional da amostra e não diferenças biológicas entre os microrganismos ou os protocolos experimentais.

A cromatografia gasosa é tecnicamente adequada para identificar e quantificar sesquiterpenos marcadores em óleos e oleorresinas de copaíba, métodos baseados em fase gasosa foram validados para *β*-cariofileno, *α*-copaeno e *α*-humuleno em amostras de copaíba (Sousa et al., 2011), e a identificação de *β*-cariofileno como composto majoritário no presente estudo permite comparar o lote utilizado com perfis já descritos na literatura, reforçando a rastreabilidade química da amostra. Entretanto, a análise por CG-FID descreve apenas a fração volátil e não equivale à caracterização

química completa do material: a fração não volátil, composta principalmente por diterpenos ácidos, requer metodologias específicas como UHPLC-MS/MS, já aplicada à determinação de ácido copálico, ácido caurenoico, ácido hardwíckico, ácido polilático e outros diterpenos em oleorresinas de *Copaifera* spp. (da Silva et al., 2017). Essa limitação tem consequência direta para a interpretação dos efeitos biológicos: os resultados não podem ser atribuídos isoladamente ao *β*-cariofileno, uma vez que a oleorresina bruta contém múltiplos constituintes potencialmente bioativos, e a ausência de caracterização quantitativa da fração diterpênica impede avaliar a contribuição relativa dos diterpenos ácidos para a atividade observada.

Esse achado fortalece a validade interna do estudo, pois demonstra que os ensaios foram conduzidos com uma amostra quimicamente rastreável e com perfil volátil compatível com oleorresinas de *Copaifera* spp. ricas em sesquiterpenos. A caracterização química realizada sustenta a comparabilidade do lote estudado com a literatura, mas não permite inferências mecanísticas definitivas sobre qual constituinte ou fração foi responsável pelos efeitos antimicrobianos detectados. Estudos futuros que integrem CG-FID ou CG-MS para a fração volátil e UHPLC-MS/MS para os diterpenos ácidos permitiriam relacionar de forma mais precisa a composição química da oleorresina com sua atividade antimicrobiana, antibiofilme e possível interação com antibióticos convencionais.

6.2 Validação das cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* VSE/VRE

A validade dos ensaios depende da correta identificação taxonômica dos isolados avaliados. Como o gênero *Enterococcus* compreende espécies com perfis distintos de virulência, resistência e adaptação ambiental, a confirmação em nível de espécie é etapa essencial para que diferenças observadas nos ensaios não sejam atribuídas a variações interespecíficas. O modelo VSE/VRE, assim, permite investigar se a oleorresina de *C. officinalis* mantém atividade frente a isolados que compartilham a mesma identidade de espécie, mas diferem em um fenótipo de resistência clinicamente crítico.

No presente trabalho, todos os isolados que haviam sido identificados por métodos bioquímicos anteriormente, foram identificados como *E. faecalis* por MALDI-TOF, apresentando escores superiores a 2,0, o que assegura a confiabilidade da identificação em nível de espécie (Kim et al., 2023).

A análise do perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas clínicas foi etapa indispensável para interpretar os ensaios posteriores com a oleorresina de *C. officinalis*, uma vez que o gênero *Enterococcus* combina resistência intrínseca a determinadas classes com elevada capacidade de adquirir novos determinantes de resistência, e a identificação da espécie isoladamente não permite inferir com segurança a susceptibilidade aos antimicrobianos de interesse (Hollenbeck et al., 2012; Khan et al., 2022).

As cepas 485, 586, 633 e 1220, sensíveis a vancomicina (VSE) apresentaram sensibilidade para ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, nitrofurantoína, estreptomicina e ciprofloxacino; contudo, resistência à tetraciclina foi observada nas cepas 485, 586 e 1220, e resistência à eritromicina nas cepas 485, 633 e 1220, reforçando que a classificação VSE designa sensibilidade fenotípica à vancomicina, e não pan-susceptibilidade antimicrobiana. Esse padrão é compatível com a literatura: meta-análise recente demonstrou ampla variação global nas taxas de resistência em isolados clínicos de *E. faecalis*, com maior frequência de resistência a tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacino e gentamicina em comparação com ampicilina, nitrofurantoína e vancomicina (Guan et al., 2024), e levantamento conduzido em Porto Alegre confirmou resistência expressiva a tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol e ciprofloxacino com baixa resistência a ampicilina e nitrofurantoína em isolados clínicos de *Enterococcus* (d'Azevedo et al., 2004).

As cepas VRE 1854, 1950, 2074 e 2390 apresentaram perfil de multirresistência mais amplo e homogêneo, com resistência para vancomicina, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, ciprofloxacino e eritromicina, seis dos nove antimicrobianos testados e sensibilidade preservada apenas à ampicilina, nitrofurantoína e estreptomicina; esse padrão está de acordo com revisões que descrevem a capacidade dos enterococos de acumular mecanismos de resistência por modificação de alvos, inativação de fármacos, bombas de efluxo e aquisição horizontal de determinantes genéticos (Hollenbeck et al., 2012; Codelia-Anjum et al., 2023).

A sensibilidade à ampicilina é coerente com o comportamento de *E. faecalis*, espécie na qual a resistência aos *β*-lactâmicos é menos frequente do que em *E. faecium*; a sensibilidade à nitrofurantoína, observada em todos os isolados incluindo os VRE, é relevante no contexto de infecções urinárias, mas com aplicabilidade clínica restrita a infecções não complicadas, sem indicação para bacteremia, endocardite ou infecções sistêmicas (Guan et al., 2024; Codelia-Anjum et al., 2023). A resistência à

gentamicina de alto nível tem implicação terapêutica direta: aminoglicosídeos exercem efeito bactericida sinérgico quando associados a agentes ativos na parede celular, e a resistência de alto nível compromete essa estratégia (Hollenbeck et al., 2012; Sparo et al., 2018); a sensibilidade preservada à estreptomicina indica, porém, que a resistência aos aminoglicosídeos não foi uniforme na classe. A resistência ao ciprofloxacino e eritromicina é compatível com mecanismos descritos para enterococos clínicos, alterações em alvos de topoisomerases e modificação ribossomal, respectivamente, embora o presente estudo não tenha realizado investigação molecular, restringindo a interpretação ao nível fenotípico (Hollenbeck et al., 2012; Codelia-Anjum et al., 2023).

Assim, o antibiograma cumpre papel central neste estudo: delimita a composição dos grupos experimentais, evidencia a maior complexidade das cepas VRE e impede interpretações simplificadas, como tratar as cepas VSE como sinônimo de susceptibilidade geral ou VRE como resistência restrita exclusivamente à vancomicina. Os dois grupos de cepas diferem não apenas quanto à vancomicina, mas quanto à amplitude e homogeneidade da resistência a outras classes de antimicrobianos, diferença importante para a interpretação dos ensaios com a oleorresina, pois indica que a atividade do produto natural foi avaliada frente a isolados com perfis basais distintos.

Apesar de a epidemiologia global dos VRE ser frequentemente dominada por *E. faecium*, a escolha de *E. faecalis* permanece justificada: é uma das principais espécies associadas a infecções enterocócicas humanas e apresenta capacidade de persistência, formação de biofilme, adaptação ao hospedeiro e aquisição de determinantes de resistência (Fiore et al., 2019). Por ser espécie relacionada a infecções do trato urinário, bacteremia, endocardite e infecções associadas a dispositivos, *E. faecalis* constitui modelo adequado para investigar a ação de compostos antimicrobianos sobre células planctônicas e biofilmes de relevância clínica.

Após a confirmação taxonômica, os isolados foram organizados em grupos fenotípicos sensíveis (VSE) e resistentes (VRE) à vancomicina. Essa separação é biologicamente relevante porque a resistência à vancomicina representa um dos principais marcos da adaptação clínica dos enterococos ao ambiente hospitalar, gênero cujos membros são patógenos oportunistas nosocomiais, cuja emergência como organismos multirresistentes decorre da combinação entre resiliência ambiental, pressão seletiva por antimicrobianos e aquisição de determinantes genéticos de resistência (Arias et al., 2012). Além disso, a classificação VRE não representa

resistência isolada à vancomicina, mas sinaliza um contexto frequentemente associado a multirresistência: *Enterococcus* apresentam resistência intrínseca a diversas classes de antimicrobianos e elevada capacidade de adquirir novos determinantes por elementos genéticos móveis, incluindo modificação de alvos, inativação enzimática, bombas de efluxo e respostas adaptativas do envelope celular (Miller et al., 2014).

As cepas VRE são, portanto, considerados patógenos de difícil manejo clínico (Miller et al., 2016), e a avaliação de produtos naturais frente a esses isolados possui interesse estratégico: permite testar compostos com possível ação por vias distintas da resistência aos glicopeptídeos, como a interação com estruturas de membrana, mecanismo associado à oleorresina de copaíba. Cabe explicitar que a resistência à vancomicina decorre da alteração dos precursores do peptidoglicano, com substituição da terminação D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lac, e não guarda relação mecanística direta com a interação com estruturas de membrana proposta para a oleorresina.

A classificação em VSE e VRE deve ser entendida como fenotípica, baseada no antibiograma, sem caracterização molecular dos genes *van*. Não é possível afirmar qual *operon* ou determinante genético específico, como *vanA*, *vanB* ou outro está presente nos isolados resistentes, razão pela qual os resultados devem ser interpretados como comparação entre perfis fenotípicos de susceptibilidade à vancomicina, e não entre genótipos específicos de resistência, conforme ressaltado pela literatura sobre triagem e controle de surtos por VRE (Faron et al., 2016). Adicionalmente, a denominação VSE não equivale a pan-susceptibilidade: as cepas VSE apresentaram resistências pontuais a outros antimicrobianos, especialmente tetraciclina e eritromicina, de modo que o eixo comparativo deste trabalho é centrado na vancomicina, e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana completo é apresentado na seção seguinte.

6.3 Espectro antibacteriano da oleorresina frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas

A triagem inicial por difusão em disco teve como objetivo verificar se a oleorresina de *C. officinalis* apresentaria atividade antibacteriana detectável frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Nas condições testadas, observou-se formação de halo de inibição contra todas as bactérias Gram-positivas avaliadas: *E.*

faecalis, *B. cereus*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Em contraste, não houve formação de halo frente às Gram-negativas testadas: *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* e *E. coli*. Esse resultado sugere um espectro qualitativo preferencial contra bactérias Gram-positivas, ao menos nas condições do ensaio empregado.

Esse padrão é compatível com estudos prévios sobre oleorresinas de *Copaifera*. Santos et al. (2008) demonstraram atividade de óleos de diferentes espécies do gênero, incluindo *C. officinalis*, frente a bactérias Gram-positivas como *S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*, *B. subtilis* e *E. faecalis*. De forma semelhante, Masson et al. (2013) observaram atividade da oleorresina de *C. langsdorffii* contra bactérias Gram-positivas de relevância clínica, incluindo *S. aureus*, *S. pyogenes* e *E. faecalis*, com menor evidência de atividade frente a Gram-negativas. Assim, a resposta observada no presente estudo não é isolada, mas coerente com o perfil descrito para as oleorresinas de copaíba.

A diferença entre Gram-positivas e Gram-negativas pode ser explicada, ao menos parcialmente, pela organização estrutural do envelope bacteriano. Compostos terpênicos e lipofílicos tendem a atuar sobre membranas celulares, alterando permeabilidade e integridade do envelope bacteriano (Nazzaro et al., 2013). Nas Gram-negativas, entretanto, a membrana externa rica em lipopolissacarídeo funciona como barreira adicional à entrada de moléculas hidrofóbicas, restringindo o acesso desses compostos à membrana citoplasmática e a alvos intracelulares (Nikaido, 2003). Esse fator é particularmente relevante para bactérias como *P. aeruginosa*, reconhecida pela baixa permeabilidade de envelope e por múltiplos mecanismos de resistência.

Apesar disso, a ausência de halo contra Gram-negativas não deve ser interpretada como prova definitiva de ausência de atividade antimicrobiana. O ensaio de difusão em disco é apropriado como triagem, mas possui limitações importantes para substâncias oleosas, viscosas ou hidrofóbicas, pois o tamanho ou a ausência de halo depende não apenas da atividade antimicrobiana, mas também da capacidade de difusão do composto no ágar (Balouiri et al., 2016). Esse problema é recorrente em testes com produtos naturais de composição complexa, nos quais solubilidade, emulsificação, interação com o meio e padronização da amostra podem interferir diretamente no resultado (Bubonja-Šonje et al., 2020; Hulankova, 2024).

Portanto, os dados deste experimento de triagem devem ser interpretados de forma restrita; a oleorresina de *C. officinalis* apresentou atividade antibacteriana qualitativa frente às Gram-positivas avaliadas e não produziu halo contra as Gram-

negativas no ensaio de difusão em disco. Esse resultado justifica o direcionamento dos ensaios subsequentes para *E. faecalis*, espécie Gram-positiva de relevância clínica e foco central do presente estudo. Para confirmar ausência de atividade contra Gram-negativas, seriam necessários ensaios quantitativos adicionais, como microdiluição em caldo, com controle rigoroso de solvente, emulsificação e concentração final da oleorresina.

6.4 Atividade inibitória, controle do DMSO e efeito bacteriostático da oleorresina

A determinação da concentração inibitória mínima demonstrou que a oleorresina de *C. officinalis* apresentou atividade inibitória frente a todos os isolados de *E. faecalis* avaliados: as cepas VSE apresentaram CIM uniforme de 1,25% v/v, e os VRE, CIM uniforme de 2,5% v/v, indicando diferença fenotípica de susceptibilidade entre as cepas, embora o estudo não tenha avaliado mecanismos moleculares específicos que explicam essa diferença. Vale notar que essa diferença corresponde a um único passo da série de diluições duplas empregada, tratando-se, portanto, de diferença de magnitude modesta e dentro da variação usualmente aceita para a técnica. Esse resultado é compatível com estudos que descrevem ação antimicrobiana de oleorresinas de *Copaifera* contra bactérias Gram-positivas (Santos et al., 2008; Masson et al., 2013; Vieira et al., 2018; Abrão et al., 2018), mas os valores de CIM relatados na literatura variam amplamente conforme a espécie vegetal, composição da amostra, microrganismo testado, solvente, emulsificação e método empregado, limitando comparações numéricas diretas. Como a CIM foi expressa em % v/v e muitos estudos relatam concentrações em µg/mL, e a densidade da oleorresina não foi medida nem a fração ativa quantificada isoladamente, a conversão seria especulativa; a comparação com a literatura deve, portanto, ser interpretada de forma qualitativa e os resultados confirmam atividade inibitória da oleorresina bruta frente a *E. faecalis*, sem equivalência direta com CIMs expressas em µg/mL por outros autores. Cabe registrar, ainda, que a densidade de inóculo empregada nos ensaios de microdiluição, de aproximadamente $7{,}5 \times 10^{7}$ UFC/mL, é superior à preconizada pelo CLSI para a técnica, de 5×10^{5} UFC/mL. Como o aumento da densidade de inóculo tende a elevar os valores de concentração inibitória mínima, os valores aqui obtidos devem ser considerados conservadores, e sua comparação direta com dados da literatura produzidos sob

condições padronizadas é limitada. A densidade foi mantida constante em todos os ensaios, de modo que as comparações internas entre isolados sensíveis e resistentes à vancomicina permanecem válidas.

O controle do DMSO demonstrou ausência de efeito antimicrobiano detectável do solvente nas concentrações correspondentes às utilizadas nos ensaios, com crescimento bacteriano confluente em todas as condições testadas, confirmando que a inibição observada é atribuível à oleorresina e não ao cossolvente (Summer et al., 2022). O subcultivo das amostras expostas à oleorresina, inclusive na concentração de 5% v/v, indicou crescimento bacteriano em todas as concentrações avaliadas: a inibição visual do crescimento em caldo não foi acompanhada de eliminação cultivável dos isolados, caracterizando efeito predominantemente bacteriostático, distinção fundamental, pois atividade bactericida exige demonstração de redução ou eliminação viável por subcultivo ou contagem de UFC (CLSI, 1999; Peterson et al., 1992). Adicionalmente, o ensaio avaliou a oleorresina bruta e não compostos isolados; não é possível atribuir o efeito inibitório ao *β*-cariofileno, ao *α*-humuleno, aos diterpenos ácidos ou a qualquer constituinte individual, uma vez que a atividade antimicrobiana de oleorresinas de *Copaifera* pode variar conforme a composição da amostra e a resposta da cepa avaliada (Vieira et al., 2018; Abrão et al., 2018).

Em síntese, a oleorresina de *C. officinalis* demonstrou atividade inibitória consistente frente a todas as cepas de *E. faecalis*, com menor concentração efetiva nas VSE e maior nos VRE. A ausência de efeito bactericida detectável não invalida a atividade antimicrobiana, mas delimita seu alcance experimental: o material testado impediu o crescimento visível em concentrações definidas sem erradicar células viáveis nas condições do ensaio, e para caracterizar o potencial letal da amostra seriam necessários ensaios adicionais, como determinação formal da concentração bactericida mínima, curvas de morte no tempo, exposição por períodos prolongados e avaliação de concentrações superiores às testadas. Tratando-se de oleorresina bruta, a atividade observada deve ser interpretada como efeito da matriz oleorresinosa total, cuja composição inclui múltiplos constituintes potencialmente bioativos, sem identificação do componente químico responsável pelo efeito.

6.5 Interações entre oleorresina e antibióticos convencionais

As interações entre a oleorresina de *C. officinalis* e antibióticos convencionais foram investigadas com caráter exploratório por ensaio de dupla difusão em disco, método útil como triagem inicial, mas sujeito à influência de solubilidade, viscosidade e capacidade de difusão no meio, especialmente para matrizes oleosas e hidrofóbicas, de modo que os resultados não devem ser interpretados como confirmação definitiva de sinergismo ou antagonismo farmacológico (Balouiri et al., 2016; Bubonja-Šonje et al., 2020). Nas cepas VSE testadas com a CIM 1,25% v/v, foram observadas 12 interações sinérgicas, 24 antagonistas e nenhuma neutra. O antagonismo predominou nas combinações com ampicilina, eritromicina, estreptomicina e nitrofurantoína, e embora a cepa 633 tenha concentrado o maior número de interações sinérgicas, esse padrão não se reproduziu nos demais isolados, impedindo a generalização da oleorresina como adjuvante nesse grupo.

Nas cepas VRE testadas com CIM 2,5% v/v, o halo individual da oleorresina foi nulo em todos os VRE, restringindo a análise às variações dos halos dos antibióticos; nos 36 pares avaliados, identificaram-se três interações de sinergismo com ampicilina frente a cepa 1854, eritromicina com a cepa 1950 e nitrofurantoína com a cepa 2390, 13 antagonistas, predominando em combinações com nitrofurantoína, cloranfenicol e tetraciclina, e 20 neutras, sem padrão potencializador consistente.

Estudos prévios com oleorresinas de *Copaifera* demonstram que interações com agentes antimicrobianos são variáveis conforme espécie vegetal, composição da amostra, cepa e método. Vieira et al. (2018) observaram interações variáveis de oleorresinas de *Copaifera* spp. com agentes desinfetantes sem padrão universal de sinergismo, e Abrão et al. (2018) demonstraram que combinações de oleorresina de *C. duckei* com diterpenos isolados contra patógenos orais não produziram necessariamente efeito sinérgico relevante. A confirmação definitiva de interações antimicrobianas requer métodos quantitativos mais robustos, como o ensaio *checkerboard* com cálculo do índice de concentração inibitória fracionária (FICI) e curvas de morte no tempo, que permitem diferenciar sinergismo, antagonismo e indiferença com maior precisão e critérios padronizados (White et al., 1996; Odds, 2003); revisões sobre testes de sinergismo ressaltam ainda que resultados *in vitro* não devem ser automaticamente extrapolados para eficácia terapêutica (Doern, 2014). No caso de produtos naturais, essa cautela deve ser ainda maior: misturas vegetais podem

conter constituintes com ações simultâneas e potencialmente opostas, e revisões sobre combinações envolvendo compostos bioativos de plantas indicam que sinergismo, antagonismo e indiferença dependem da composição da mistura, da concentração, do microrganismo e do método experimental (Vaou et al., 2022), razão pela qual o predomínio de antagonismo no presente estudo não deve ser interpretado como propriedade universal da oleorresina.

Em suma, o ensaio de dupla difusão em disco não demonstrou efeito potencializador consistente da oleorresina de *C. officinalis* sobre os antibióticos convencionais testados: embora sinergismos pontuais tenham ocorrido, o antagonismo predominou entre os pares interpretáveis, especialmente nos isolados VRE. O caráter exploratório do método, a hidrofobicidade da matriz, a presença de pares indeterminados e a ausência de métodos quantitativos confirmatórios impedem concluir que a oleorresina exerce antagonismo terapêutico em sentido amplo. A interpretação mais defensável é que as interações observadas foram variáveis, dependentes do isolado e do antibiótico, e insuficientes para sustentar efeito sinérgico consistente.

6.6 Avaliação da integridade da membrana bacteriana por microscopia confocal de varredura a laser

No presente estudo, o comportamento dos controles reforça a consistência interna do ensaio: os controles negativos de viabilidade exibiram ausência quase completa de sinal FDA (0,02 ± 0,02 UA) e sinal IP elevado (407,5 ± 138,7 UA), enquanto os controles positivos apresentaram razão IP/FDA inferior a 0,08 em todos os isolados, compatível com elevada viabilidade celular — resultado esperado para a marcação dual FDA/IP, técnica cuja aplicabilidade para *E. faecalis* em biofilme foi demonstrada por Zapata et al. (2008). A interpretação da marcação por IP exige, contudo, cautela como demonstrado por Rosenberg et al. (2019) demonstraram, em biofilmes de *S. epidermidis* e *E. coli*, que o IP pode superestimar a proporção de células mortas em razão da ligação ao DNA extracelular (eDNA) da matriz, produzindo sinal vermelho não necessariamente associado à morte celular individual — comportamento coerente com o sinal IP basal mensurável nos controles positivos não tratados deste estudo (VSE: 11,3 ± 15,2 UA; VRE: 26,6 ± 20,2 UA), de modo que a razão IP/FDA deve ser interpretada como índice semiquantitativo de alteração da integridade de membrana e da atividade metabólica, e não como estimativa absoluta do percentual de células

mortas, sendo necessária sua análise em conjunto com UFC e CMEB quando o objetivo for inferir erradicação efetiva do biofilme.

A ausência de inversão da razão IP/FDA nos controles de DMSO — com razões entre 0,010 e 0,237 em todas as condições testadas — confirma que o solvente não exerceu efeito citotóxico relevante sobre os biofilmes nas concentrações empregadas. Esse resultado é relevante porque o DMSO é frequentemente utilizado como cossolvente em ensaios com compostos hidrofóbicos, e sua interferência sobre a viabilidade celular é uma fonte de confundimento reconhecida na literatura (Summer et al., 2022). A validação do controle de solvente garante que as alterações de fluorescência observadas nos grupos tratados com oleorresina sejam atribuíveis ao composto estudado, e não ao veículo. As diferenças visuais entre os grupos VSE e VRE nas reconstruções tridimensionais reforçam esse ponto, antecipando o padrão de resposta diferencial que a análise quantitativa confirma.

Nas cepas VSE, o efeito foi dose-dependente. Na CIM, todas as cepas apresentaram redução de FDA e elevação do sinal IP sem atingir inversão da razão IP/FDA — padrão compatível com lesão subletal de membrana. Esse resultado é esperado: a matriz extracelular, a heterogeneidade fisiológica das células sésseis e subpopulações metabolicamente menos ativas limitam a eficácia local de compostos antimicrobianos em biofilme, e concentrações subinibitórias podem ainda estimular a formação de biofilme em isolados clínicos de *E. faecalis* (Bernardi et al., 2021). Na 2× CIM, três dos quatro isolados (485, 586 e 1220) atingiram inversão da razão IP/FDA, com reduções de FDA entre 83,2% e 96,5%, caracterizando morte celular predominante. O isolado 633 foi exceção, com razão limítrofe de 0,863 ± 0,145, sugerindo heterogeneidade intragrupo possivelmente relacionada à composição da matriz ou à penetração da oleorresina nas camadas mais profundas do biofilme.

Esses achados são compatíveis com o mecanismo de ação descrito para as oleorresinas de *Copaifera* spp. Santos et al. (2008) demonstraram, por microscopia eletrônica, que oleorresinas de *C. martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata* causam ruptura da parede celular, extravasamento citoplasmático e redução do volume celular em bactérias Gram-positivas, incluindo *E. faecalis*, efeitos atribuídos à interação dos sesquiterpenos e diterpenos hidrofóbicos com o peptidoglicano e os ácidos teicóicos. De forma convergente, Morguette et al. (2019) demonstraram atividade antibiofilme dose-dependente de oleorresina de *C. officinalis* contra *Streptococcus agalactiae*, com alterações ultraestruturais compatíveis com dano à membrana plasmática. .

Nas cepas VRE, o padrão de resposta foi distinto: na CIM nenhuma cepa apresentou inversão da razão IP/FDA (razões entre 0,138 e 0,166), mas o sinal IP nos biofilmes tratados foi 10 a 20 vezes superior ao dos controles DMSO CIM, indicando dano mensurável à membrana sem predomínio de morte celular, e as reconstruções tridimensionais confirmaram aumento do sinal vermelho com persistência de focos de fluorescência verde, indicando manutenção de subpopulações metabolicamente ativas. Esse resultado é coerente com o conceito de CMEB. Sun e Song (2011) demonstraram que isolados de *E. faecalis* em biofilme exigem concentrações superiores às planctônicas para controle efetivo, em razão de mecanismos como difusão retardada pela matriz, células persistentes e gradientes metabólicos, fatores que nos VRE podem ser potencializados pela maior tolerância ao estresse, persistência ambiental e expressão de fatores de virulência relacionados à formação e manutenção do biofilme (Geraldes et al., 2022). Na 2× CIM todas as cepas VRE apresentaram reduções expressivas de FDA (75,2% a 83,6%), mas apenas a cepa 2074 atingiu inversão média da razão IP/FDA (1,180 ± 0,723), com inversão confirmada em uma das réplicas; as cepas 1854, 1950 e 2390 mantiveram razão IP/FDA abaixo de 1,0 apesar da forte redução de FDA, padrão compatível com comprometimento metabólico substancial sem permeabilização de membrana predominante, hipótese plausível é que parte do efeito nas VRE envolva desorganização da matriz ou dispersão parcial do biofilme, e não apenas lise celular clássica, configurando um efeito parcial mas mensurável com comprometimento mais acentuado da atividade metabólica do que da integridade estrutural de membrana.

A comparação entre os fenótipos evidencia que a oleorresina exerceu atividade nos dois grupos, mas com intensidade distinta. As cepas VSE atingiram morte celular predominante com maior frequência na 2× CIM, enquanto os VRE exibiram maior tolerância. Esse padrão indica que a resistência à vancomicina não conferiu proteção completa contra a oleorresina, mas esteve associada a resposta menos intensa. Resultado semelhante é relatado com oleorresinas de *Copaifera* frente a bactérias Gram-positivas de relevância clínica, com variação entre espécies atribuída a diferenças na proporção de sesquiterpenos e diterpenos bioativos (Masson et al., 2013). Deve-se considerar ainda que biofilmes são estrutural e fisiologicamente mais tolerantes que células planctônicas, e que a eficácia de compostos hidrofóbicos depende tanto da concentração quanto da composição química da amostra.

As reconstruções tridimensionais reforçam essa conclusão. Na

concentração de 2× CIM, o biofilme VSE exibiu redução mais acentuada do sinal verde e predomínio mais evidente do sinal vermelho. O biofilme das cepas VRE, por sua vez, manteve focos de fluorescência verde em maior frequência, acompanhando o padrão quantitativo. A altura aparente dos biofilmes não deve ser utilizada como indicador de eficácia antimicrobiana: variações de espessura refletem crescimento in vitro, heterogeneidade entre campos e características individuais de cada isolado. A análise tridimensional deve ser interpretada, portanto, como evidência morfológica complementar — que reforça visualmente a diferença de resposta entre os fenótipos já estabelecida pelos dados quantitativos. Em conjunto, os dados de MCVL indicam que a oleorresina compromete a atividade metabólica e a integridade de membrana de biofilmes de *E. faecalis* de forma dose-dependente, com resposta mais intensa nos VSE e efeito parcial, mas mensurável, nos VRE.

A técnica FDA/IP, entretanto, não permite afirmar a erradicação completa do biofilme nem distinguir entre morte celular, redução metabólica e dispersão da biomassa. Para caracterizar de forma mais robusta o potencial antibiofilme da oleorresina, seria necessária a determinação da CMEB associada à contagem de UFC. Os resultados sustentam a atividade da oleorresina sobre biofilmes de *E. faecalis*, mas delimitam essa interpretação como evidência semiquantitativa de dano celular não de comprovação de erradicação bacteriana.

O presente estudo apresenta limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. A caracterização química foi restrita à fração volátil por CG-FID, sem análise quantitativa da fração diterpênica não volátil por UHPLC-MS/MS, impedindo a avaliação da contribuição relativa dos diterpenos ácidos para a atividade observada. A utilização de oleorresina bruta impossibilita a atribuição do efeito a constituintes individuais, e a ausência de medição de densidade e quantificação da fração ativa limita comparações numéricas com estudos que expressam CIM em µg/mL. A classificação das cepas em VSE e VRE baseou-se exclusivamente no antibiograma, sem genotipagem molecular dos determinantes *van*, restringindo as conclusões ao nível fenotípico. A atividade bactericida não foi formalmente avaliada por determinação da concentração bactericida mínima ou curvas de morte no tempo. No contexto do biofilme, a técnica FDA/IP fornece evidência semiquantitativa que não permite distinguir entre morte celular, redução metabólica e dispersão da biomassa, e a concentração mínima de erradicação de biofilme não foi determinada. Os ensaios de sinergismo, conduzidos por método exploratório sem quantificação do índice de concentração

inibitória fracionária, não permitem conclusões sobre interações farmacológicas em sentido estrito.

Com base nos resultados e nas limitações identificadas, os principais encaminhamentos para estudos futuros são: (i) caracterização da fração diterpênica não volátil por UHPLC-MS/MS e isolamento de constituintes individuais, como *β*-cariofileno, *α*-humuleno e diterpenos ácidos, para identificação dos responsáveis pela atividade antimicrobiana; (ii) determinação formal da concentração bactericida mínima e de curvas de morte no tempo, para melhor caracterização do potencial letal da oleorresina; (iii) genotipagem molecular dos determinantes *van* nos isolados VRE, para aprofundamento da caracterização do modelo experimental; (iv) determinação da concentração mínima de erradicação de biofilme, associada à contagem de unidades formadoras de colônia e ao emprego de métodos complementares de quantificação de biomassa; (v) realização de ensaios quantitativos de interação antimicrobiana, como *checkerboard* com cálculo do índice de concentração inibitória fracionária, para avaliar o potencial de combinação da oleorresina com antibióticos convencionais em condições mais controladas; (vi) avaliação em modelos *in vivo* para estimativa do potencial terapêutico, da toxicidade e da biodisponibilidade do produto; (vii) avaliação de sistemas de nanoencapsulamento da oleorresina, com vistas à melhoria de sua solubilidade e estabilidade em meio aquoso; (viii) realização de ensaios de citotoxicidade em linhagens celulares, para estimativa do índice de seletividade; (ix) inclusão de antimicrobianos de última linha, entre eles a daptomicina, como comparadores em ensaios de interação. Em conjunto, esses encaminhamentos permitiriam avançar da caracterização exploratória apresentada neste trabalho para a compreensão mecanística e pré-clínica da atividade antimicrobiana e antibiofilme da oleorresina de *C. officinalis* frente a *E. faecalis*, com potencial contribuição para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas frente a fenótipos de resistência clinicamente relevantes.

7 CONCLUSÃO

- A oleorresina de *Copaifera officinalis* apresentou atividade antibacteriana qualitativa apenas contra as bactérias Gram-positivas avaliadas, com formação de halos de inibição no ensaio de difusão em disco, não sendo observada atividade frente às bactérias Gram-negativas testadas.
- A oleorresina apresentou atividade inibitória predominantemente bacteriostática contra todos os isolados clínicos de *E. faecalis* avaliados, incluindo cepas sensíveis e resistentes à vancomicina, embora estas últimas tenham demonstrado menor suscetibilidade.
- A concentração inibitória mínima variou entre os isolados clínicos VSE e VRE. A diferença de CIM entre os grupos sugere que o fenótipo de resistência à vancomicina está associado a menor susceptibilidade à oleorresina nas condições do ensaio.
- A dupla difusão em disco não demonstrou potencialização consistente da oleorresina sobre os antibióticos avaliados, com predominância de antagonismo em VSE e VRE e ocorrência apenas pontual de sinergismo, em padrão dependente do isolado e do antimicrobiano, o que limita a interpretação dos achados a um caráter exploratório.
- A microscopia confocal com marcação FDA/IP demonstrou atividade dose-dependente da oleorresina sobre biofilmes de *E. faecalis*, com efeito mais intenso em isolados VSE, caracterizado por maior morte celular, enquanto os VRE apresentaram resposta menos acentuada, indicando que a resistência à vancomicina não impede a ação da oleorresina, mas reduz sua intensidade.

8 REFERÊNCIAS

ABRÃO, F. et al. Antibacterial effect of *Copaifera duckei* Dwyer oleoresin and its main diterpenes against oral pathogens and their cytotoxic effect. Frontiers in Microbiology, v. 9, p. 201, 2018.

ALMEIDA-BEZERRA, J. W. et al. ADME/Tox study and the effect of β-caryophyllene on the resistant strain of *Staphylococcus aureus* carrying the QacA/B efflux pump gene. Toxicology Reports, v. 14, art. 101929, 2025.

ANTOCHEVIS, L. C. et al. World Health Organization priority antimicrobial resistance in healthcare-associated bloodstream infections in Brazil (ASCENSION). The Lancet Regional Health – Americas, v. 43, p. 101004, 2025.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. Nature Reviews Microbiology, v. 10, n. 4, p. 266-278, 2012.

ARRUDA, C. et al. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 109, p. 1-20, 2019.

ATTALLAH, N. G. M. et al. Antibacterial, immunomodulatory, and lung protective effects of *Boswellia dalzielii* oleoresin ethanol extract in pulmonary diseases: in vitro and in vivo studies. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2021, 2021.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. Journal of Pharmaceutical Analysis, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

BERNARDI, S. et al. Subinhibitory antibiotic concentrations enhance biofilm formation of clinical *Enterococcus faecalis* isolates. Antibiotics, v. 10, n. 7, p. 874, 2021.

BUBONJA-ŠONJE, M.; KNEŽEVIĆ, S.; ABRAM, M. Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, v. 71, n. 4, p. 300-311, 2020.

CARDINELLI, C. C. et al. Toxicological effects of copaiba oil (*Copaifera* spp.) and its active components. Plants, v. 12, n. 5, p. 1054, 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Antibiotic resistance Threats in the United States**. 2013. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/media/pdfs/ar-threats-2013-

08.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2026.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Antibiotic resistance Threats in the United States.** 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/media/pdfs/2019-ar-threats-report-508.pdf>. Acesso em 22 mai. 2026.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **National Healthcare Safety Network (NHSN). HAI Pathogens and Antimicrobial Resistance Report, 2018- 2021**. Atlanta, GA: CDC; 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/nhsn/hai-report/narrative-commentary.html>. Acesso em 22 mai. 2026.

CH'NG, J.-H. et al. Biofilm-associated infection by enterococci. Nature Reviews Microbiology, v. 17, n. 2, p. 82–94, 2019.

CIMEN, C. et al. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in hospital settings across European borders. Antimicrobial Resistance & Infection Control, v. 12, p. 78, 2023.

CIMMINO, A. et al. Sesquiterpene lactones *from Cotula cinerea* with antibiotic activity against clinical isolates of Enterococcus faecalis. Antibiotics, v. 10, n. 7, art. 819, 2021.

CLARKE, J. M.; GILLINGS, M. R.; ALTAVILLA, N.; BEATTIE, A. J. Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. Journal of Microbiological Methods, v. 46, n. 3, p. 261-267, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. CLSI document M26-A. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 1999.

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.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. CLSI supplement M100. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023.

CODELIA-ANJUM, A. et al. Enterococcal urinary tract infections: a review of the pathogenicity, epidemiology, and treatment. Antibiotics, v. 12, n. 4, p. 778, 2023.

COSTA, C. L. S. et al. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. Chemistry & Biodiversity, v. 8, 2011.

D'AZEVEDO, P. A. et al. Antimicrobial susceptibility among Enterococcus isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 35, p. 199-204, 2004.

DA SILVA, C. A. P. et al. Action of betulinic acid in the inhibition of efflux pump NorA in *Staphylococcus aureus* strains: in vitro and in silico approaches. Chemistry & Biodiversity, v. 23, n. 2, art. e02869, 2026.

DA SILVA, J. J. M. et al. Development of a validated ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of acid diterpenes in *Copaifera* oleoresins. Journal of Chromatography A, v. 1515, p. 81-90, 2017.

DA SILVA RODRIGUES-CORRÊA, K. C.; DE LIMA, J. C.; FETT-NETO, A. G. Oleoresins from Pine: Production and Industrial Uses. In: RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J.-M. (Eds.). Natural Products. Berlin: Springer, 2013. p. 4037-4060.

DA TRINDADE, R.; DA SILVA, J. K.; SETZER, W. N. *Copaifera* of the Neotropics: a review of the phytochemistry and pharmacology. International Journal of Molecular Sciences, v. 19, n. 5, p. 1511, 2018.

DAHHAM, S. S. et al. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β-caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. Molecules, v. 20, n. 7, p. 11808-11829, 2015.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DE ALMEIDA JÚNIOR, J. S. et al. Anti-inflammatory potential of the oleoresin from the Amazonian tree *Copaifera reticulata* with an unusual chemical composition in rats. Veterinary Sciences, v. 8, n. 12, p. 320, 2021.

DE MELLO, N. P.; CARLOS RAMOS ESPINOZA, F.; DA SILVA CLAUDIANO, G. et al. Copaiba oil's bactericidal activity and its effects on health and zootechnical performance for Nile tilapia after oral supplementation. Scientific Reports, v. 14, n. 17405, 2024.

DIAS, K. J. S. O. et al. Terpenes as bacterial efflux pump inhibitors: A systematic review. Frontiers in Pharmacology, v. 13, art. 953982, 2022.

DOERN, C. D. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. Journal of Clinical Microbiology, v. 52, n. 12, p. 4124-4128, 2014.

DOMINGUES, S.; NIELSEN, K. M. Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes. Current Opinion in Microbiology, v. 38, p. 16-21, 2017.

FARON, M. L.; LEDEBOER, N. A.; BUCHAN, B. W. Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant Enterococcus in the health care setting. Journal of Clinical Microbiology, v. 54, n. 10, p. 2436-2447, 2016.

FIORE, E.; VAN TYNE, D.; GILMORE, M. S. Pathogenicity of enterococci. Microbiology Spectrum, v. 7, n. 4, 2019.

FLEMING, A. Penicillin. Nobel Lecture, Nobel Prize in Physiology or Medicine, 1945.

FRAZÃO, D. R. et al. Evaluation of the biological activities of Copaiba (Copaifera spp.): a comprehensive review based on scientometric analysis. Frontiers in Pharmacology, v. 14, 2023.

FUKUSHIGE, M. et al. Trend in healthcare-associated infections due to vancomycin-resistant Enterococcus at a hospital in the era of COVID-19. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, v. 55, p. 1211-1218, 2022.

GARCIA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. Clinical Microbiology Reviews, v. 32, p. 1-28, 2019.

GARGATE, N. et al. Current economic and regulatory challenges in developing antibiotics for Gram-negative bacteria. Antimicrobial Resistance, 2025.

GBD 2021 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. The Lancet, v. 404, n. 10459, p. 1199-1226, 2024.

GERALDES, C. et al. *Enterococcus* virulence and resistant traits associated with its permanence in the hospital environment. Antibiotics, v. 11, n. 7, p. 857, 2022.

GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, n. 26, p. 9099- 9104, 2008.

GUAN, L. et al. Global status of antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus* faecalis isolates: systematic review and meta-analysis. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, v. 23, p. 80, 2024.

HAIDARI, H. et al. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis. Journal of Infection and Public Health, 2022.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in

Enterococcus. Virulence, v. 3, n. 5, p. 421-433, 2012.

HULANKOVA, R. Methods for Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils: A Review. Plants, v. 13, n. 19, p. 2784, 2024.

IQBAL, F. et al. Vancomycin-resistant enterococci: a rising challenge to global health. Clinical Epidemiology and Global Health, v. 28, art. 101663, 2024

KARIUKI, S. Global burden of antimicrobial resistance and forecasts to 2050. The Lancet, v. 404, p. 1172-1173, 2024.

KHAN, A. et al. Antimicrobial Susceptibility Testing for Enterococci. Journal of Clinical Microbiology, v. 60, n. 9, 2022.

KIM, S. H. et al. Identification and phylogenetic analysis of *Enterococcus* isolates using MALDI-TOF MS and VITEK 2. AMB Express, v. 13, n. 1, p. 21, 2023.

KUPCOVA, K. et al. Boswellic acids as effective antibacterial antibiofilm agents. Molecules, v. 27, n. 12, art. 3795, 2022.

LEE, J. et al. Chemical Characterization and Quality Assessment of Copaiba Oil-Resin Using GC/MS and SFC/MS. Plants, v. 12, n. 8, p. 1619, 2023.

LEHMKUHL, J. et al. Role of membrane vesicles in the transmission of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. Scientific Reports, v. 14, p. 1895, 2024.

LI, G. et al. Vancomycin resistance in *Enterococcus* and *Staphylococcus aureus*. Microorganisms, v. 11, n. 9, p. 2271, 2023.

LIRA-GUEDES, Ana Cláudia. **Copaibeiras (*Copaifera* sp.) em floresta nativa na Amazônia** [fotografia]. Embrapa Amapá, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/4617006/copaibeiras-copaifera-sp-em-floresta-nativa-na-amazonia>. Acesso em: 22 maio 2026.

LIRA-GUEDES, Ana Cláudia. **Copaíba** [fotografia]. Embrapa Amapá, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-imagens/-/midia/5115002/copaiba>. Acesso em: 22 maio 2026.

LIRA-GUEDES, Ana Cláudia. **Copaíba** [fotografia]. Embrapa Amapá, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/5115003/copaiba>. Acesso em: 22 maio 2026.

MASSON, D. S. et al. Atividade antimicrobiana do oleorresina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 15, n. 4 (supl. 1), p. 664-669, 2013

MEDEIROS, R. S. et al. Comparative anatomy of oleoresin producing and non-producing trees of *Copaifera multijuga* Hayne in primary forests and plantations.

Flora, v. 263, p. 151552, 2020.

MELCHIORRI, D. et al. Addressing urgent priorities in antibiotic development: insights from WHO 2023 antibacterial clinical pipeline analyses. The Lancet Microbe, 2024.

MILLAR, B. C. et al. Antimicrobial Resistance: The Answers. British Journal of Biomedical Science, v. 83, art. 15559, 2026.

MILLER, W. R.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. Expert Review of Anti-Infective Therapy, v. 12, n. 10, p. 1221-1236, 2014.

MILLER, W. R.; MURRAY, B. E.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Vancomycin-resistant enterococci: therapeutic challenges in the 21st century. Infectious Disease Clinics of North America, v. 30, n. 2, p. 415-439, 2016.

MOO, C.-L. et al. Antibacterial activity and mode of action of β-caryophyllene on *Bacillus cereus*. Polish Journal of Microbiology, v. 69, n. 1, p. 49–54, 2020

MORGUETTE, A. E. B. et al. Hydrogel containing oleoresin from Copaifera officinalis presents antibacterial activity against *Streptococcus agalactiae*. Frontiers in Microbiology, v. 10, p. 2806, 2019.

MOUSSAIEFF, A.; MECHOULAM, R. Boswellia resin: from religious ceremonies to medical uses; a review of in-vitro, in-vivo and clinical trials. Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 61, n. 10, p. 1281-1293, 2009.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiology Spectrum, v. 4, n. 2, 2016.

MURRAY, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet, v. 399, p. 629-655, 2022.

NAZZARO, F. et al. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. Pharmaceuticals, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NEGREIROS, M. O. 2014. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de *Heterothalamus* sp. sobre *Enterococcus faecalis***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 67, n. 4, p. 593-656, 2003.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and

recommendations. London: Review on Antimicrobial Resistance, 2016.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 52, n. 1, p. 1, 2003

PETERSON, L. R.; SHANHOLTZER, C. J. Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. Clinical Microbiology Reviews, v. 5, n. 4, p. 420-432, 1992.

PFEIFER BARBOSA, A. L. et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. Journal of Ethnopharmacology, v. 233, p. 94-100, 2019.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

PLUMERYA® ÓLEOS ESSENCIAIS. **Óleo resina copaíba da Amazônia 20mL**. s.d. Disponível em: <https://www.plumerya.com/oleo-resina/oleo-resina-copaiba-da-amazonia-20ml>. Acesso em: 22 maio 2026.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. Pathogens and Global Health, v. 109, n. 7, p. 309-318, 2015.

RASHAN, L. et al. Chemical composition, antibacterial activity, and antibiotic potentiation of *Boswellia sacra* Flueck. oleoresin extracts from the Dhofar Region of Oman. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2021, art. 9918935, 2021.

RIBOLDI, G. P.; FRAZZON, J.; D'AZEVEDO, P. A.; FRAZZON, A. P. G. Antimicrobial resistance profile of Enterococcus spp isolated from food in Southern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, n. 1, p. 125-128, 2009.

ROCHA, Rafael. **Óleo de copaíba** [fotografia]. Embrapa Rondônia, 2017. Disponível em:<https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/3712001/oleo-decopaiba>. Acesso em: 22 maio 2026.

RODRIGUES, T. M.; MACHADO, S. R. Developmental and structural features of secretory canals in root and shoot wood of *Copaifera langsdorffii* Desf. (*Leguminosae– Caesalpinioideae*). Trees, v. 23, p. 1013-1018, 2009.

ROSENBERG, M.; AZEVEDO, N. F.; IVASK, A. Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. Scientific Reports, v. 9, art. 6483, 2019.

RUHAL, R. et al. Biofilm-specific determinants of enterococci pathogen. Archives of Microbiology, v. 206, n. 397, 2024.

SADANANDAN, B. et al. *Enterococcus faecalis* biofilm: a clinical and environmental hazard. Proceedings of the 4th International Electronic Conference on Antibiotics, 2025.

SAHAY, Dr. ***Enterococcus faecalis* – coloração de Gram** [fotografia]. 2013. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Enterococcus_faecalis.jpg>. Acesso em: 22 maio 2026.

SALDANHA FILHO, L. A. et al. Integrated in vitro, in vivo, molecular docking, and ADMET in silico assessment of β-caryophyllene as a NorA efflux pump inhibitor in resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Current Microbiology, 2025.

SAMPAIO, M. A. L. et al. Antibacterial and antibiotic-modifying activity of the commercialized essential oil of *Copaifera* spp. associated with LED lights against a *Staphylococcus aureus* strain. Journal of Functional Foods, v. 114, art. 106075, 2024.

SANTANA, J. E. G. et al. Liposomal nanoformulations with trans-caryophyllene and caryophyllene oxide: do they have an inhibitory action on the efflux pumps NorA, Tet(K), MsrA, and MepA? Chemistry–Biological Interactions, v. 393, art. 110945, 2024.

SANTIAGO, M. B.; SANTOS, R. A. dos; MARTINS, C. H. G. **Guia das copaíbas: pra quê serve?** Recife: ObservaPICS, 2021. p. 21. Disponível em: <https://observapics.fiocruz.br/wp-content/uploads/2022/01/Guia-das-Copaibas-ObservaPICS.pdf>. Acesso em: 22 maio 2026.

SANTOS, A. O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008.

SEYHAN, A. A. Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide. Translational Medicine Communications, v. 4, p. 18, 2019.

SI, Z. et al. Chemical basis of combination therapy to combat antibiotic resistance. JACS Au, v. 3, p. 276-292, 2023

SILVA, J. S. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* infections in a hospital in Salvador, Bahia: a descriptive study, 2021-2023. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2024.

SOUSA, J. P. B. et al. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 54, n. 4, p. 653-659, 2011.

SPARO, M. et al. Impact on Public Health of the Spread of High-Level Resistance to Gentamicin and Vancomycin in Enterococci. Frontiers in Microbiology, v. 9, p. 3073, 2018.

SUMMER, K.; BROWNE, J.; HOLLANDERS, M.; BENKENDORFF, K. Out of control: the need for standardized solvent approaches and data reporting in antibiofilm assays incorporating dimethyl-sulfoxide (DMSO). Biofilm, v. 4, p. 100081, 2022.

SUN, J.; SONG, X. Assessment of antimicrobial susceptibility of Enterococcus faecalis isolated from chronic periodontitis in biofilm versus planktonic phase. Journal of Periodontology, v. 82, n. 4, p. 626-631, 2011.

TCHATCHIASHVILI, T. et al. CAM/TMA-DPH as a promising alternative to SYTO9/PI for cell viability assessment in bacterial biofilms. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 14, art. 1508016, 2025.

VAN SCHAIK, W. et al. Resistance to last-resort antibiotics in enterococci. FEMS Microbiology Reviews, 2024.

VAOU, N. et al. Interactions between Medical Plant-Derived Bioactive Compounds: Focus on Antimicrobial Combination Effects. Antibiotics, v. 11, n. 8, p. 1014, 2022.

VASCONCELOS, T. M. et al. Outbreak of vancomycin-resistant Enterococcus faecium ST1133 in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia from southern Brazil. Journal of Global Antimicrobial Resistance, v. 36, p. 41-44, 2024.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. Pharmacy and Therapeutics, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

VIEIRA, R. G. L. et al. In vitro studies of the antibacterial activity of Copaifera spp. oleoresins, sodium hypochlorite, and peracetic acid against clinical and environmental isolates recovered from a hemodialysis unit. Antimicrobial Resistance & Infection Control, v. 7, p. 14, 2018.

WEI, Y.; PALACIOS ARAYA, D.; PALMER, K. L. *Enterococcus faecium*: evolution, adaptation, pathogenesis and emerging therapeutics. Nature Reviews Microbiology, v. 22, n. 11, p. 705-721, 2024.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Analysis of antibacterial agents in clinical and preclinical development: overview and analysis 2025. Geneva: WHO, 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva: WHO, 2020.

YARAHMADI, A. et al. Beyond antibiotics: exploring multifaceted approaches to combat bacterial resistance in the modern era. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 15, 2025.

ZAPATA, R. O. et al. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. Journal of Endodontics, v. 34, n. 10, p. 1198-1201, 2008.

ZENG, D. et al. Approved glycopeptide antibacterial drugs: mechanism of action and resistance. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 6, p. a026989, 2016.

ZHAN, X. et al. The antimicrobial and antibiofilm activity of oregano essential oil against *Enterococcus faecalis* and its application in chicken breast. Foods, v. 11, n. 15, art. 2296, 2022.