

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

INGRID VIANEZ PEREGRINO

EFEITOS DA 1,10-FENANTROLINA-5,6-DIONA E SEUS DERIVADOS METÁLICOS
SOBRE AMOSTRAS CLÍNICAS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE
CARBAPENEMASE KPC: POTENCIAL SINÉRGICO COM CARBAPENÊMICOS

VITÓRIA, ES

2018

INGRID VIANEZ PEREGRINO

**EFEITOS DA 1,10-FENANTROLINA-5,6-DIONA E SEUS DERIVADOS METÁLICOS
SOBRE AMOSTRAS CLÍNICAS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE
CARBAPENEMASE KPC: POTENCIAL SINÉRGICO COM CARBAPENÊMICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós- Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Ferreira Nunes (UFES)

Coorientador: Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos (UFRJ)

VITÓRIA, ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal
do Espírito Santo, ES, Brasil)

Peregrino, Ingrid Vianez, 1991 -

P435e Efeitos da 1,10-fenantrolina-5,6-diona e seus derivados metálicos sobre amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase KPC : potencial sinérgico com carbapenêmicos / Ingrid Vianez Peregrino - 2018.
117 f. : il.

Orientador: Ana Paula Ferreira Nunes.

Coorientador: André Luis Souza dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Anti-Infecciosos. 2. Sinergismo Farmacológico. 3. Carbapenêmicos. 4. Doenças Transmissíveis. I. Nunes, Ana Paula Ferreira. II. Santos, André Luis Souza dos. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

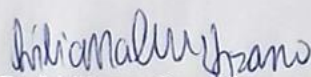


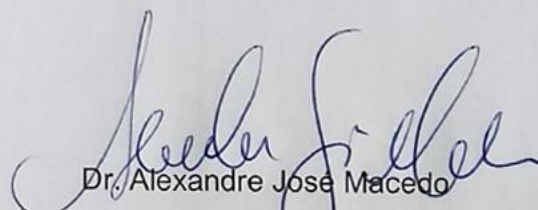
**PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO**

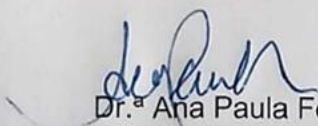
A mestrand **Ingrid Vianez Peregrino** apresentou a dissertação intitulada **“Efeitos da 1,10-fenantrolina-5,6-diona e seus derivados metálicos sobre amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de Carbapenemase KPC: potencial sinérgico com carbapenêmicos”** em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a dissertação habilitando a biomédica INGRID VIANEZ PEREGRINO a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 24 de maio de 2018.


Dr.ª Liliana Cruz Spano
(Membro Interno)


Dr. Alexandre José Macedo
(Membro Externo)


Dr.ª Ana Paula Ferreira Nunes
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus: Aquele que guia meus caminhos e os escolhe, antes mesmo de mim. E também Aquele que segura a minha mão durante todo o percurso. E antes de agradecer a qualquer pessoa, agradeço novamente a Deus, por ter colocado em meu caminho cada uma delas.

Assim, agradeço a toda a minha família por tanto amor. Especialmente aos meus pais, aos meus irmãos, à minha madrinha e ao Rhuan, por serem, depois de Deus, minha maior fonte de força e ânimo, meu maior apoio, e para os quais eu desejo ser sempre motivo de orgulho.

Aos colegas que estiveram ao meu lado durante essa jornada, e especialmente aqueles que foram mais longe e tornaram-se meus amigos, pelo apoio emocional. A todos os colegas do RESBAC e do LabCAS pelos momentos e conhecimentos compartilhados e por todo auxílio durante os experimentos. Especialmente à Roberta e ao Pedro, por contribuírem ativamente com o meu trabalho, com tamanha dedicação e boa-vontade que me faltam palavras para agradecer.

À professora Ana Paula, pela oportunidade, pela confiança e pelo comprometimento com o meu trabalho. Também pelos ensinamentos e por contribuir constantemente com a minha evolução durante esses dois anos. Obrigada por tornar tudo isso possível. Ao professor André, também pela contribuição com a minha evolução, pela disponibilidade e por, mesmo à distância, participar ativamente do desenvolvimento do meu trabalho, sempre de forma tão solícita.

Ao professor Ricardo Pinto Schuenck, pela parceria e pela concessão das amostras utilizadas nesse trabalho. Aos técnicos e servidores do setor de microbiologia da UFES, por tanta disponibilidade em ajudar. Aos professores e servidores do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas (UFES) por impulsionar meu crescimento intelectual, compartilhando um pouco de seus conhecimentos.

Às agências financiadoras, que permitiram que esse projeto fosse realizado: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC (Kp-KPC) constituem uma grande ameaça para a prática clínica, visto que são associadas a elevadas taxas de mortalidade e possuem escassas opções terapêuticas disponíveis. Atualmente estão sendo detectadas cepas dessa bactéria com resistência a todos os agentes antimicrobianos conhecidos, corroborando a urgente necessidade por novos tratamentos eficazes. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de fendiona e seus derivados, Cu-fendiona e Ag-fendiona, sozinhos e combinados aos carbapenêmicos meropenem (MPM) e imipenem (IMP) em diferentes amostras de Kp-KPC, *in vitro* e em modelo de *Galleria mellonella*. Para tal foram investigados: (i) os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração bactericida mínima (CBM) dos compostos; (ii) o efeito da combinação dos compostos com MPM e IMP por meio de *checkerboard* e curva tempo-morte; e (iii) o efeito de combinações sinérgicas em modelo “*in vivo*” de *G. mellonella*. Os resultados obtidos pela determinação da CIM e da CBM demonstraram boa atividade antimicrobiana pelos três compostos contra todas as 46 amostras. Os valores médios da CIM de fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona foram 42,06, 9,88, e 10,10 µg/ml, respectivamente. Por meio do *checkerboard* foram testadas combinações dos compostos com MPM e IMP sobre 9 amostras clonalmente não-relacionadas, e não foi observada a presença de efeitos indiferentes ou antagônicos em qualquer uma das seis combinações testadas. Maiores taxas de sinergismo foram observadas nas três combinações contendo MPM, sendo esse efeito detectado em 66,67%, 77,78%, e 33,33% das amostras quando em associação a fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona, respectivamente. Pelo método de curva tempo-morte foram testadas as combinações de MPM com Cu-fendiona e Ag-fendiona sobre duas amostras clonalmente não-relacionadas. Foi demonstrado que as combinações contendo concentrações de $\frac{1}{2}$ xCIM de cada agente produziram efeito sinérgico, sendo verificado entre nove e 12 horas de teste. Observou-se que a combinação de MPM com o composto Ag-fendiona foi capaz de erradicar o inóculo (10^6 UFC/mL) aplicado no teste. Os níveis de toxicidade aguda de fendiona e seus derivados foram avaliados em modelo de *G. mellonella*, sendo os resultados considerados satisfatórios no que se refere à utilização desses compostos sozinhos ou combinados. A eficácia das combinações foi também

avaliada *in vivo* em modelo de infecção de *G. mellonella* sobre as mesmas duas amostras empregadas na curva tempo-morte. Foi verificada uma superioridade estaticamente significativa do tratamento com as combinações em relação à administração dos agentes sozinhos. Assim, os resultados obtidos no nosso estudo demonstram o potencial de fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona como candidatos a fármacos sozinhos ou combinados a antimicrobianos carbapenêmicos.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana. *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC. Derivados da fenantrolina. Testes de sinergismo. *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

Infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* KPC (Kp-KPC) pose a major threat to clinical practice as they are associated with high mortality rates and have scarce therapeutic options available. Currently, isolates resistant to all known antimicrobials have been described, reinforcing the urgent need for new effective treatments. The present study aimed to evaluate the effects of fendiona and its derivatives, Cu-fendiona and Ag-fendiona, alone and combined with the carbapenems meropenem (MPM) and imipenem (IMP) in different Kp-KPC strains, *in vitro* and in the model of *Galleria mellonella*. For this purpose, we investigated: (i) the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bacterial concentrations (MBC) of the compounds; (ii) the effects of combining the compounds with MPM and IMP by checkerboard assay and time-kill method; and (iii) the effect of synergistic combinations on the *in vivo* model of *G. mellonella*. The results obtained by MIC and MBC determination demonstrated good antimicrobial activity by the three compounds against all 46 strains. The mean MIC values of fendione, Cu-fendione and Ag-fendione were 42.06, 9.88, and 10.10 µg/mL, respectively. Combinations of the compounds with MPM and IMP were tested by checkerboard assay on 9 non-clonally related strains, and no indifferent or antagonistic effects were observed in any of the six combinations tested. Higher synergism rates were obtained by the combinations containing MPM, being this effect detected in 66.67%, 77.78%, and 33.33% of the strains when in association with fendione, Cu-fendione and Ag-fendione, respectively. Combinations of MPM with Cu-fendione and Ag-fendione were tested by time-kill method on 2 non-clonally related strains. Combinations containing $\frac{1}{2}$ x MIC of each agent have been demonstrate to produce synergistic effect, verified between 9 and 12 hours of activity. It was observed that the combination of MPM with the compound Ag-fendione was able to eradicate the inoculum (10^6 CFU/mL) applied in the test. Acute toxicity levels of fendione and its derivatives have been evaluated in the *G. mellonella* model, and the results was considered satisfactory with respect to the use of these compounds alone or in combination. The efficacy of the combinations was also evaluated *in vivo* in *G. mellonella* infection model with the same 2 strains used in time-kill method. A statistically significant superiority of the treatment with the combinations over the administration of the agents alone was found. Thus, the results obtained in our study

demonstrate the potential of fendione, Cu-fendione and Ag-fendione as drug candidates alone or in combination with carbapenem antimicrobials.

Keywords: Antimicrobial resistance. KPC producing *Klebsiella pneumoniae*. Phenantroline derivatives. Synergy tests. *Galleria mellonella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia de <i>Klebsiella pneumonia</i>	22
Figura 2 - Principais fatores de virulência de <i>K. pneumoniae</i>	24
Figura 3 - Antimicrobianos beta-lactâmicos clinicamente relevantes	27
Figura 4 - Estruturas químicas de 1,10-fenantrolina, 1,10-fenantrolina-5,6-diona, [Cu(fendiona) ₃](ClO ₄) ₂ ·4H ₂ O e [Ag(fendiona) ₂]ClO ₄	38
Figura 5 - Determinação do Índice Terapêutico (IT) a partir dos dados de exposição	42
Figura 6 - Larvas de <i>G. mellonella</i> como modelo de infecção <i>in vivo</i>	44
Figura 7 - Fluxograma dos experimentos selecionados para a avaliação da atividade antimicrobiana de fendiona e seus derivados de forma isolada e combinada a carbapenêmicos em 46 amostras de <i>K. pneumoniae</i>	51
Figura 8 - Avaliação de combinações antimicrobianas pelo método de <i>checkerboard</i> evidenciando o esquema empregado nas placas de microtitulação com simulação de resultados.....	54
Figura 9 - Inoculação em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	58
Figura 10 - Valores de CIM para as 46 amostras de <i>K. pneumoniae</i> testadas frente a fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona.....	62
Figura 11 - Comparação entre os valores de Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) das combinações com meropenem e com imipenem	71
Figura 12 - Classificação da suscetibilidade das amostras ao meropenem em ação desse sozinho e combinado a fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona.....	73
Figura 13 - Classificação da suscetibilidade das amostras ao imipenem em ação desse sozinho e combinado a fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona.....	73
Figura 14 - Curva tempo-morte da amostra clínica 5B tratada com a combinação de MPM a 16 µg/mL (¹ / ₄ xCIM) x Cu-fendiona a 3,12 µg/mL (¹ / ₄ xCIM)	74
Figura 15 - Curva tempo-morte da amostra clínica 5B tratada com a combinação de MPM a 16 µg/mL (¹ / ₄ xCIM) x Ag-fendiona a 0,78 µg/mL (¹ / ₈ xCIM)	75
Figura 16 - Curva tempo-morte da amostra clínica 51B tratada com a combinação de MPM a 1,0 µg/mL (¹ / ₈ xCIM) x Cu-fendiona a 1,56 µg/mL (¹ / ₈ xCIM)	75
Figura 17 - Curva tempo-morte da amostra clínica 51B tratada com a combinação de MPM a 0,5 µg/mL (¹ / ₁₆ xCIM) x Ag-fendiona a 1,56 µg/mL (¹ / ₄ xCIM)	76

Figura 18 - Curva tempo-morte da amostra clínica 5B tratada com a combinação de MPM a 32 µg/mL ($1/2$ xCIM) x Cu-fendiona a 6,25 µg/mL ($1/2$ xCIM)	77
Figura 19 - Curva tempo-morte da amostra clínica 5B tratada com a combinação de MPM a 32 µg/mL($1/2$ xCIM)x Ag-fendiona a 3,12 µg/mL ($1/2$ xCIM)	77
Figura 20 - Curva tempo-morte da amostra clínica 51B tratada com a combinação de MPM a 0,5 µg/mL ($1/2$ xCIM) x Cu-fendiona a 1,56 µg/mL ($1/2$ xCIM)	78
Figura 21 - Curva tempo-morte da amostra clínica 51B tratada com a combinação de MPM a 0,5 µg/mL ($1/2$ xCIM) x Cu-fendiona a 1,56 µg/mL ($1/2$ xCIM)	78
Figura 22 - Alterações de pigmentação em larvas de <i>G. mellonella</i>	80
Figura 23 - Taxas de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com inóculo de <i>K. pneumoniae</i> em concentração de 10^4 UFC	81
Figura 24 - Taxas de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com inóculo de <i>K. pneumoniae</i> em concentração de 10^5 UFC	81
Figura 25 - Taxas de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com inóculo de <i>K. pneumoniae</i> em concentração de 10^6 UFC	82
Figura 26 - Taxas de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com a amostra 5B e posteriormente tratadas com MPM e Cu-fendiona sozinhos e combinados entre si	83
Figura 27 - Taxas de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com a amostra 51B e posteriormente tratadas com MPM e Cu-fendiona sozinhos e combinados entre si	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Visão geral das beta-lactamases, substratos, classificação e atividade inibitória.....	29
Tabela 2 - Valores de CIM para <i>K. pneumoniae</i> frente a fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona e sais de prata e cobre	62
Tabela 3 - Valores de CBM e MG-CIM da fendionae seus derivados no crescimento de amostras de <i>K. pneumoniae</i> (n=46)	63
Tabela 4 - Efeito da associação de meropenem com fendiona por meio do método de <i>checkerboard</i> sobre amostras de <i>K. pneumoniae</i>	65
Tabela 5 - Efeito da associação de meropenem com Cu-fendiona por meio do método de <i>checkerboard</i> sobre amostras de <i>K. pneumoniae</i>	66
Tabela 6 - Efeito da associação de meropenem com Ag-fendiona por meio do método de <i>checkerboard</i> sobre amostras de <i>K. pneumoniae</i>	67
Tabela 7 - Efeito da associação de imipenem com fendiona por meio do método de <i>checkerboard</i> sobre amostras de <i>K. pneumoniae</i>	68
Tabela 8 - Efeito da associação de imipenem com Cu-fendiona por meio do método de <i>checkerboard</i> sobre amostras de <i>K. pneumoniae</i>	69
Tabela 9 - Efeito da associação de imipenem com Ag-fendiona por meio do método de <i>checkerboard</i> sobre amostras de <i>K. pneumoniae</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. baumannii - *Acinetobacter baumannii*

Ag-fendiona - $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$

AgNO_3 - Nitrato de prata

AN - Ágar Nutriente

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

B. subtilis - *Bacillus subtilis*

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CBM50 - Concentração Bactericida Mínima capaz de levar à morte de 50% das cepas avaliadas

CBM90 - Concentração Bactericida Mínima capaz de levar à morte de 90% das cepas avaliadas

CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*)

C. haemulonii - *Candida haemulonii*

CIF - Concentração Inibitória Fracionada

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CIM50 - Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das cepas avaliadas

CIM90 - Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas avaliadas

CLSI - Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CRE - Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos (do inglês, *Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*)

CTX-M - Beta-lactamase Cefotaximase

CO_2 - dióxido de carbono

Cu-fendiona - $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

CuSO_4 – Sulfato de Cobre

DHA-1 - do inglês Dhahran Hospital in Saudi Arabia

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico

DO - Densidade Ótica

E. coli - *Escherichia coli*

ESBL - Beta-Lactamases de Espectro Estendido (do inglês, *extended-spectrum beta-lactamases*)

FAPES - Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo

FDA - (do inglês, *food and drug administration*)

Fenantrolina - 1,10-fenantrolina

Fendiona - 1,10-fenantrolina-5,6-diona

GES - do inglês Guiana extended spectrum beta-lactamase

G. mellonella - *Galleria mellonella*

H₂S - sulfeto de hidrogênio

ICIF - Índice de Concentração Inibitória Fracionada

IMP - Imipenem

IT - Índice Terapêutico

K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Kp-KPC - *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC

LACEN-ES - Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo

LPS - Lipopolissacarídeo

MBL - Metallo-beta-lactamases

MDR - Resistência a múltiplas drogas (do inglês *multidrug resistance*)

MG-CBM - Média Geométrica da Concentração Bactericida Mínima

MG-CIM - Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima

MHA - Ágar Mueller-Hinton

MHB-ca - Caldo Mueller-Hinton cátion ajustado

MPM - Meropenem

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

OMS - Organização Mundial da Saúde

OXA - Oxacilinase

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBP - Proteína ligante de penicilina (do inglês *penicillin binding protein*)

PBS - Tampão Fosfato Salino (do inglês, *Phosphate-buffered saline*)

pH - Potencial hidrogeniônico

PK-PD - Farmacocinética e Farmacodinâmica

PO - Fenoloxidase

ProPO - Pró-fenoloxidase inativo

RAM – Resistência Antimicrobiana

RESBAC - Laboratório de Resistência Antimicrobiana

SHV - Beta-lactamase *Sulphydryl variable*

SMART - Estudo para Monitoramento das Tendências de Resistência Antimicrobiana (do inglês, *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance*)

TEM - Beta-lactamase Temoneira

TSB - Caldo Triptona de Soja (do inglês *Tryptone Soya Broth*)

TSI - Triplo Açúcar Ferro (do inglês, *Triple Sugar Iron*)

UFCs - Unidades Formadoras de Colônias

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
2.2 Antimicrobianos Carbapenêmicos	25
2.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase KPC	31
2.4 Opções terapêuticas para infecções por Kp-KPC	34
2.5 Fendiona e seus derivados	36
2.6 Avaliação do potencial terapêutico de candidatos a fármacos antimicrobianos	38
2.7 <i>Galleria mellonella</i> como modelo <i>in vivo</i> para testes de suscetibilidade a antimicrobianos	43
3 JUSTIFICATIVA	48
4 OBJETIVOS	49
4.1 Objetivo Geral	49
4.2 Objetivos Específicos	49
5 MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1 Amostras bacterianas	50
5.2 Compostos	50
5.3 Delineamento Experimental	51
5.4 Identificação fenotípica	52
5.5 Efeitos de fendiona e seus derivados sobre o crescimento das amostras de <i>K. pneumoniae</i>	52
5.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima	52
5.5.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	53
5.6 Efeitos de fendiona e seus derivados combinados a carbapenêmicos sobre o crescimento das amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	53
5.6.1 Método <i>Checkerboard</i>	53
5.6.2 Curva de tempo-morte	55
5.7 Efeitos de fendiona e seus derivados sozinhos ou em combinação a carbapenêmicos em modelo <i>in vivo</i> de <i>G. mellonella</i>	56
5.7.1 Criação e manutenção das larvas de <i>G. mellonella</i>	56
5.7.2 Teste de toxicidade <i>in vivo</i> de fendiona e seus derivados e do meropenem	57

5.7.4 Infecção e índice de sobrevivência	57
5.7.5 Avaliação dos efeitos das combinações antimicrobianas em modelo de infecção de <i>G. mellonella</i>	59
5.8 Estatísticas e correlações.....	60
6 RESULTADOS	61
6.1 Identificação fenotípica.....	61
6.2 Efeitos de fendiona e seus derivados sobre o crescimento das amostras de <i>K. pneumoniae</i>	61
6.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima.....	61
6.2.2 Determinação da concentração bactericida mínima.....	63
6.3 Efeitos de fendiona e seus derivados combinados a carbapenêmicos sobre amostras de <i>K. pneumoniae</i>	63
6.3.1 Método <i>Checkerboard</i>	63
6.3.2 Curva de tempo-morte.....	74
6.4 Efeitos fendiona e seus derivados sozinhos ou em combinação a carbapenêmicos em modelo invertebrado de <i>G. mellonella</i>	79
6.4.1 Teste de toxicidade de fendiona e seus derivados e do meropenem.....	79
6.4.3 Infecção e índice de sobrevivência	80
6.4.4 Avaliação dos efeitos das combinações antimicrobianas em modelo de infecção de <i>G. mellonella</i>	82
7 DISCUSSÃO	84
8 CONCLUSÕES	97
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXO A - VISÃO GERAL DOS DADOS DE SUSCETIBILIDADE AOS CARBAPENÊMICOS E PERFIL GENÉTICO DAS 46 AMOSTRAS DE <i>K. pneumoniae</i>	115

1 INTRODUÇÃO

A terapia antimicrobiana tem sido o pilar da medicina moderna durante as últimas oito décadas, permitindo e auxiliando muitos dos procedimentos médicos atuais, como a realização de cirurgias, o transplante de órgãos e o tratamento contra o câncer (LAXMINARAYAN et al., 2016). A redução da eficácia dos antimicrobianos é um fenômeno mundial, que é agravado pelo uso inadequado desses fármacos na saúde humana e animal, exacerbado pela globalização e pressionado pela falta de investimento e desenvolvimento de novos medicamentos (LOUREIRO et al., 2016; WERNLI et al., 2017). O uso inapropriado de antimicrobianos ocorre por parte dos profissionais de saúde e dos consumidores, particularmente na comunidade, onde estão concentrados 80% do consumo. Nos hospitais, o emprego de antimicrobianos de amplo espectro como profilaxia pós-operatória permanece prevalente, contribuindo com esse cenário preocupante (WERNLI et al., 2017). A pressão seletiva decorrente da utilização dos antimicrobianos tem acelerado a disseminação da resistência a antimicrobianos (RAM), tornando real a possibilidade de uma era pós-antibiótica, em que infecções comuns, bem como pequenas injúrias, poderão levar à morte (JONES; DAVIS; LOOKE, 2017; REARDON, 2014).

A RAM é um dos maiores problemas da comunidade médica atualmente, com implicações além de terapêuticas, também financeiras e econômicas, haja vista o número crescente de infecções causadas por microrganismos que não respondem a nenhuma classe conhecida de antimicrobiano (LAXMINARAYAN et al., 2016; SHARLAND; SAROEY; BEREZIN, 2015). Foi recentemente estimado que, na ausência de políticas que impeçam a propagação da RAM, as mortes em sua decorrência podem saltar do valor atual de aproximadamente 700.000 por ano em todo o mundo para cerca de 10 milhões por ano em 2050 (O'NEILL, 2016). A correlação entre RAM e infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) é bem estabelecida (ALBRICH et al., 1999; HUTTNER et al., 2013). As altas taxas de IRAS, aliadas ao aumento do tempo gasto em ambientes de assistência à saúde, estabelecem uma contínua dependência dos antimicrobianos, ao mesmo tempo em que amplificam a pressão seletiva que favorece a evolução da RAM (LAXMINARAYAN et al., 2016; MULVEY; SIMOR, 2009).

Klebsiella pneumoniae é um dos patógenos mais preocupantes envolvidos no contexto da RAM e, como tal, foi incluído no grupo chamado de ESKAPE,

juntamente com *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp., representando os maiores desafios para a prática clínica (RICE, 2008; NAVON-VENEZIA et al., 2017). A rápida disseminação de determinantes de resistência entre microrganismos Gram-negativos aumentou a preocupação acerca dos agentes terapêuticos disponíveis, e sobre quanto tempo eles permanecerão efetivos (RELLO; BUNSOW; PEREZ, 2016). Corroborando esse cenário, um estudo publicado recentemente notificou a ocorrência de infecção por uma cepa de *K. pneumoniae* pan-resistente, em um paciente que evoluiu a óbito por choque séptico. A suscetibilidade dessa cepa foi testada frente a 26 antimicrobianos distintos e ela demonstrou resistência a todos eles (CHEN et al., 2017).

A resistência a beta-lactâmicos em *K. pneumoniae* ocorre principalmente pela produção de enzimas beta-lactamases, como as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e as carbapenemases (XU; SUN; MA, 2017). *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL comumente apresenta um fenótipo de multirresistência (MDR), uma vez que os genes que codificam essas enzimas então frequentemente contidos em plasmídeos que também albergam genes de resistência a outras classes antimicrobianas (PADMINI et al., 2017). Os carbapenêmicos representam a terapia de primeira linha para infecção grave por *K. pneumoniae* ESBL positiva, entretanto, o crescente número de isolados dessa espécie carreando genes de carbapenemases situa essas infecções como um sério problema na prática clínica (VADING et al., 2018; XU; SUN; MA, 2017). Entre as carbapenemases, grande importância é dada à *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC), sendo essas as beta-lactamases mais frequentemente detectadas em cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos (SOTGIU et al., 2018). Enquanto os mecanismos moleculares de resistência continuam a evoluir, a epidemiologia de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos demonstra sua crescente disseminação (LOGAN; WEINSTEIN, 2017). Relatórios de vigilância emitidos por organizações internacionais relatam que, desde 2012, vem ocorrendo um aumento de 15% a 20% ao ano em culturas de Enterobacteriaceae produtoras de KPC, comprovando sua rápida e constante evolução (RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou, em maio de 2015, o Plano de Ação Global em Resistência a Antimicrobianos, ressaltando a necessidade de medidas de combate e esse fenômeno. Cinco principais objetivos foram propostos e,

entre eles, encontra-se o comprometimento financeiro com investimentos em novos medicamentos, ferramentas de diagnóstico, vacinas e outras intervenções, além da promoção de pesquisa e vigilância para ampliar o conhecimento sobre RAM (OMS, 2015). Corroborando a necessidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos, a OMS divulgou em 2017 uma lista contendo as bactérias resistentes consideradas como patógenos de prioridade global, para as quais há uma necessidade urgente de novos tratamentos efetivos. No grupo mais alarmante encontram-se as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de 3ª geração, incluindo as *K. pneumoniae* produtoras de KPC (Kp-KPC) (OMS, 2017). Nesse sentido, o estabelecimento de uma nova classe de antimicrobianos, desencadeando mecanismo de ação por meio de vias distintas daquelas dos agentes já em uso clínico, forneceria substanciais benefícios (RELLO; BUNSOW; PEREZ, 2016). Assim, a 1,10-fenantrolina (fenantrolina) e seus derivados, principalmente a 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), constituem uma classe promissora de agentes quelantes (VIGANOR et al., 2015). Diversos estudos demonstraram a capacidade inibitória desses compostos sobre uma gama de microrganismos, como *Candida albicans* (MCCANN et al., 2000), *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (ROY et al., 2008), *Leishmania braziliensis* (LIMA, 2012), *Trypanosoma cruzi* (SANTOS et al., 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (VIGANOR et al., 2015), *Candida haemulonii* (GANDRA et al., 2017), entre outros microrganismos. Fenantrolina, fendiona e seus derivados são sintetizados por meio de processos relativamente simples e sem custo elevado (GANDRA et al., 2017) e demonstraram reduzida toxicidade por meio de testes *in vivo*, exibindo boa tolerabilidade em larvas de *Galleria mellonella* e camundongos suíços, condições essas que favorecem sua futura aceitação clínica (MCCANN et al., 2012a).

Entre as estratégias propostas para o tratamento de Kp-KPC, a mais estudada atualmente é a combinação de antimicrobianos (DIEP et al., 2016; HUANG et al., 2017; SOULI et al., 2017; WENTAO et al., 2018). Evidências sugerem que a combinação de dois ou mais fármacos que apresentam atividade contra o isolado pode exibir menores taxas de falência terapêutica quando comparada à monoterapia, reduzindo assim a mortalidade (PIEDRA-CARRASCO et al., 2017; YU et al., 2017). Tem sido demonstrado para o tratamento de Kp-KPC que regimes de combinação incluindo um carbapenêmico como suporte principal são mais efetivos em apresentar aditividade ou sinergismo com outros agentes (DAIKOS et al., 2014;

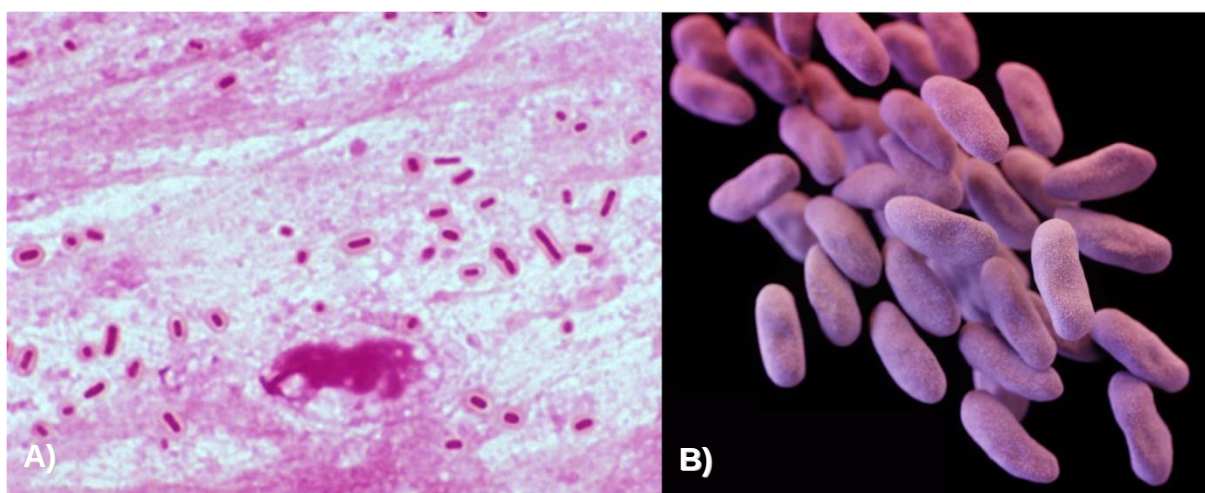
TUMBARELLO et al., 2015). Apesar dos benefícios demonstrados pela combinação antimicrobiana, muitas questões ainda não foram esclarecidas, como quais combinações utilizar e quando elas devem incluir um carbapenêmico, refletindo a necessidade de novos estudos sobre combinações antimicrobianas (LEWIS, 2016).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, membro da família Enterobacteriaceae, foi isolada pela primeira vez, em 1882, pelo microbiologista e patologista alemão Carl Friedländer, a partir de pacientes evoluídos a óbito, após contrair pneumonia (VUOTTO et al., 2014). Inicialmente chamado de bacilo de Friedländer, foi renomeada *K. pneumoniae* em 1886, após a criação do gênero por V. Trevisan, em homenagem ao médico, patologista e microbiologista Edwin Klebs (STÜRCHLER, 2016; VUOTTO et al., 2014). É uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, encapsulada, não móvel e descrita como saprófita, sendo assim um constituinte da microbiota do trato gastrointestinal, da pele e da nasofaringe de humanos e animais saudáveis (Figura 1) (KAUR; VADIVELU; CHANDRAMATHI, 2018; VUOTTO et al., 2014). É considerado um microrganismo oportunista, comumente envolvido em infecções extra-intestinais, como as do trato urinário, de ferida cirúrgica, cistite, pneumonia e infecções potencialmente fatais, como endocardite e septicemia (NAVON- VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; PACZOSA; MECSAS, 2016; PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

Figura 1 - Morfologia de *Klebsiella pneumoniae*

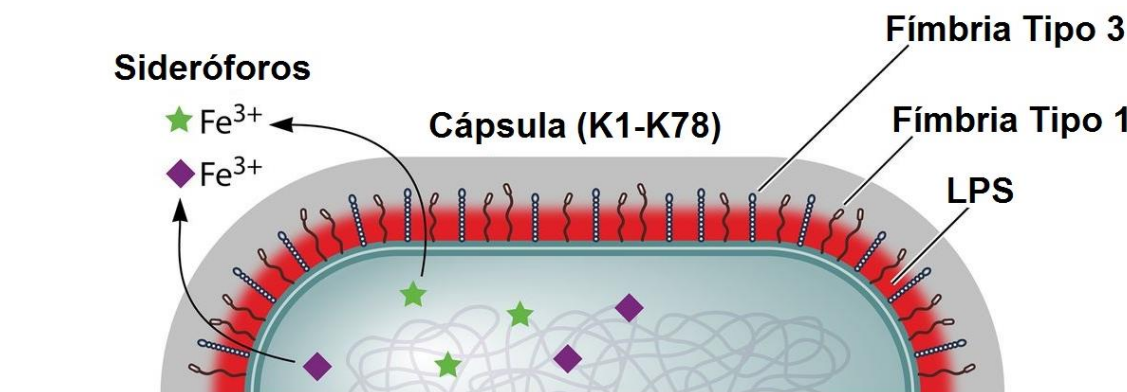


- A) Bacterioscopia de preparação de escarro sob coloração de Gram, em aumento de 1000x, evidenciando células de *K. pneumoniae* em forma de bastonete com formação de cápsula ao redor
B) Células de *K. pneumoniae* em microscopia eletrônica de varredura

FONTE: Adaptado dos sites da Universidade Médica Estadual de Horbachevsky Ternopil e da Divisão de Controle de Surto de Doenças do Departamento de Saúde do Havaí

Para a sua sobrevivência no interior do hospedeiro, *K. pneumoniae* apresenta uma vasta gama de fatores de virulência, os quais desempenham um papel vital na evasão da resposta imunitária do hospedeiro e na produção de danos ao mesmo (KAUR; VADIVELU; CHANDRAMATHI, 2018). Os fatores de virulência que desempenham papel importante na severidade das infecções por *K. pneumoniae* são os polissacarídeos capsulares, as fímbrias, o lipopolissacarídeo (LPS) e os sideróforos (Figura 2) (VUOTTO et al., 2014). A cápsula, uma matriz polissacarídica que reveste a célula, é imprescindível para a virulência dessa espécie, e constitui o fator de virulência mais amplamente estudado de *K. pneumoniae* (PACZOSA; MECSAS, 2016). A cápsula fornece proteção contra a resposta imunitária do hospedeiro por meio de múltiplos mecanismos, incluindo a inibição da fagocitose pelos fagócitos, o bloqueio da ativação da resposta imunitária inata e supressão da lise pelo sistema complemento e pelos peptídeos antimicrobianos (KAUR; VADIVELU; CHANDRAMATHI, 2018; PACZOSA; MECSAS, 2016). É composta por um polissacarídeo ácido, denominado como antígeno K, que determina o sorotipo capsular empregado na distinção entre as cepas de *K. pneumoniae* (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Entre os 78 tipos capsulares descritos para essa espécie, K1 e K2 são considerados os mais virulentos, diferenciando-se dos demais sorotipos por não possuir repetições específicas de resíduos de manose em sua estrutura capsular, impedindo assim a sua detecção por macrófagos (JANDA, 2015; PACZOSA; MECSAS, 2016). As fímbrias, entre as quais destacam-se as do tipo 1 e 3, consistem em estruturas adesivas, auxiliando os processos de fixação e colonização tecidual (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; PACZOSA; MECSAS, 2016). O LPS é uma endotoxina que confere proteção contra a resposta imunitária do hospedeiro, além de produzir danos por meio de indução da liberação de citocinas e quimiocinas no local da inflamação (KAUR; VADIVELU; CHANDRAMATHI, 2018). Os sideróforos são sintetizados e liberados pela bactéria quando ocorre uma redução nos níveis de ferro livre e são capazes de sequestrar esse metal das proteínas do hospedeiro, como a hemoglobina e a ferritina (PACZOSA; MECSAS, 2016). Apesar do vasto arsenal de fatores de virulência, *K. pneumoniae* é considerado um patógeno oportunista, visto que esses são capazes de se manifestar apenas em situações de perturbação no seu hospedeiro, como no caso de imunodeficiência, presença de comorbidades e/ou lesões na pele (BROWN; CORNFORTH; MIDEO, 2014).

Figura 2 – Principais fatores de virulência de *K. pneumoniae*



FONTE: Adaptado de Paczosa e Mecsas (2016)

K. pneumoniae, na era pré-antibiótica, foi considerado como um importante agente oportunista, causador de infecções adquiridas na comunidade, incluindo formas graves de pneumonia, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; VUOTTO et al, 2014). A partir do início dos anos 1970, a epidemiologia de *K. pneumoniae* e seu espectro de infecções mudaram significativamente quando esse microrganismo se estabeleceu no ambiente hospitalar e tornou-se uma das principais causas de infecções nosocomiais (VUOTTO et al, 2014). Seu elevado potencial de colonização, aliado à aquisição de resistência a diversos antimicrobianos, permitiu que *K. pneumoniae* persistisse e se difundisse rapidamente em ambientes relacionados à assistência à saúde. As infecções nosocomiais mais comumente causadas por esse agente são as do trato urinário, de feridas e sítio cirúrgico, de tecidos moles, dos pulmões, da cavidade abdominal, aquelas que envolvem dispositivos intravasculares e bacteremia subsequente (JANDA, 2015; VUOTTO et al, 2014).

Ainda hoje, as infecções nosocomiais por *Klebsiella* spp. continuam produzindo grande impacto na economia e na expectativa de vida de pacientes, principalmente nos países desenvolvidos (VUOTTO et al., 2014). *Klebsiella pneumoniae* é responsável por aproximadamente um terço de todas as infecções nosocomiais causadas por bactérias Gram-negativas, estando atrás apenas de *Escherichia coli* como a que mais causa bacteremias e infecções do trato urinário em ambientes hospitalares, afetando primariamente pacientes que fazem uso de dispositivos médicos invasivos (KAUR 2018; PACZOSA; MECSAS, 2016; VUOTTO et al., 2014). De fato, *K. pneumoniae* tem sido relatada como importante causadora

de infecções em indivíduos utilizando cateteres vesicais de demora (VADING et al., 2018; VUOTTO et al., 2014). As crescentes evidências sobre a capacidade de *K. pneumoniae* em formar biofilme, principalmente em dispositivos médicos invasivos, e a correlação de tal comportamento com a aquisição de resistência a antimicrobianos aumentam o nível de preocupação com esse microrganismo em ambientes hospitalares (VUOTTO et al., 2014). Ademais à utilização de dispositivos médicos, infecções da corrente sanguínea por *K. pneumoniae*, geralmente surgem como uma complicação de infecções focais urinárias, gastrointestinais ou respiratórias e estão associadas a comorbidades como câncer, diabetes e transplante prévio de órgãos (MEATHERALL et al., 2009; VADING et al., 2018).

2.2 Antimicrobianos Carbapenêmicos

A origem da quimioterapia ocorreu no primeiro século d.C por meio da fitoterapia descrita na obra do médico grego Dioscórides. Contudo, apenas em 1917 o desenvolvimento de antimicrobianos teve seu início, e sofreu notória evolução a partir dos estudos de Alexander Fleming. Em 1928, Fleming descobriu acidentalmente a penicilina inibindo uma cepa de *Staphylococcus aureus* e, no ano seguinte, sua descoberta já havia caído no esquecimento. Em meados de 1936, o doutor Chain e Sir Howerd Florey retomaram os estudos sobre a penicilina, tornando possível o seu isolamento em 1939, somente 11 anos após a sua descoberta (KARDOS; DEMAINE, 2013). A penicilina foi a pioneira do grupo dos beta-lactâmicos, que até os dias atuais permanecem como os agentes antimicrobianos mais vastamente prescritos contra infecções tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade, devido principalmente a uma longa manutenção de sua eficácia e segurança (KATTAN; VILLEGAS; QUINN, 2008; MELETIS, 2016).

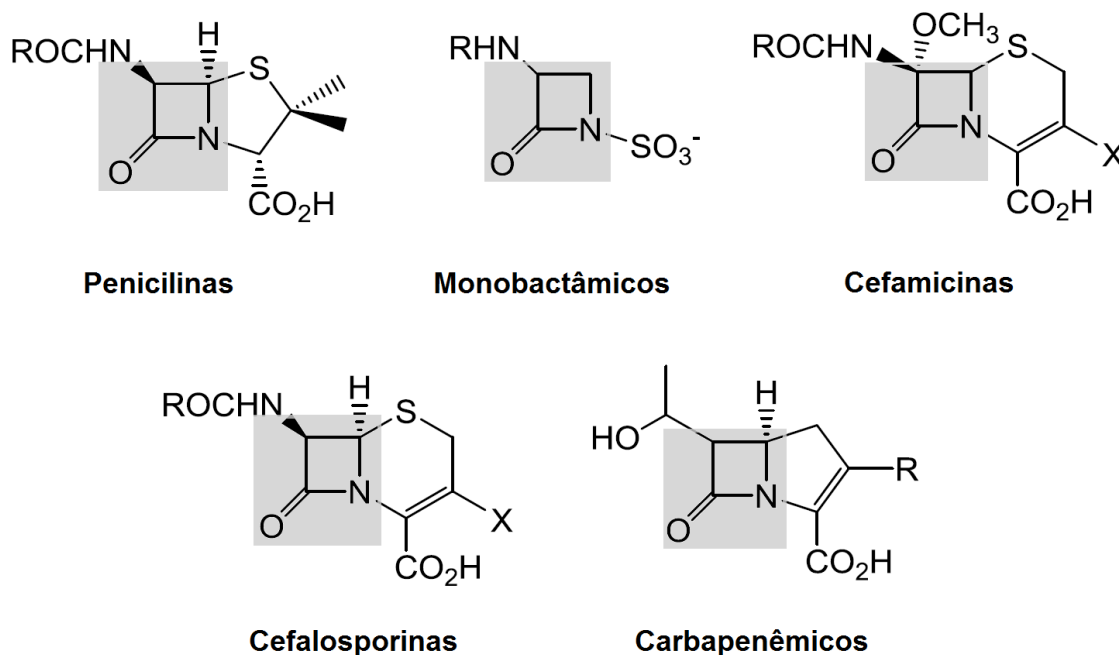
Entre a família dos beta-lactâmicos, os carbapenêmicos constituem o subgrupo mais potente e, portanto, são normalmente reservados para o tratamento de pacientes com doenças graves e de infecções graves causadas por organismos multirresistentes (KATTAN; VILLEGAS; QUINN, 2008; NICOLAU, 2008). Esse subgrupo é considerado o de maior espectro de ação entre os beta-lactâmicos, destacando-se também por proporcionar eficácia em concentrações mínimas (CHO et al., 2018; JORGENSEN; RYBAK, 2018). Entre os fatores que contribuem para essa elevada atividade, destacam-se por serem moléculas menores, em

comparação com as cefalosporinas, e por serem íons dipolares, possuindo cargas positiva e negativa quando em solução. Essas duas propriedades facilitam a penetração rápida através da membrana externa de bactérias Gram-negativas (KATTAN; VILLEGAS; QUINN, 2008). Assim, as indicações de tratamento empírico com carbapenêmicos incluem pneumonias comunitária e nosocomial (na ausência de *S. aureus* resistente à meticilina), infecções complicadas do trato urinário, da pele e de tecidos moles, neutropenia febril, septicemia, infecções intra-abdominais complicadas, meningite, infecção do pé diabético e fibrose cística (BREILH et al., 2013; NICOLAU, 2008).

Os beta-lactâmicos compartilham uma estrutura comum, o anel lactâmico de quatro membros, porém os carbapenêmicos diferem de outros antimicrobianos do grupo por possuírem um átomo de carbono ao invés de sulfona na quarta posição da porção tiazolidínica do anel beta-lactâmico (Figura 3) (KATTAN; VILLEGAS; QUINN, 2008). Essa estrutura confere excepcional estabilidade contra a maioria das beta-lactamases (enzimas que inativam os beta-lactâmicos) incluindo ampicilina e carbenicilina (AmpC) e beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) (MELETIS, 2016). Os carbapenêmicos são agentes bactericidas de ação rápida, visto que se ligam com alta afinidade à maioria das proteínas de ligação à penicilina (PBPs) de alta massa molecular, inibindo assim, a síntese da parede celular bacteriana (BREILH et al., 2013; JORGENSEN; RYBAK, 2018). Atualmente, quatro carbapenêmicos são utilizados clinicamente: imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem (TSAI et al, 2013). Em Enterobacteriaceae, tanto o imipenem quanto o meropenem exibem maior afinidade pela PBP2, apesar de também se ligarem efetivamente às PBP1a e PBP1b, com adição de afinidade pela PBP3 apenas para o meropenem (JORGENSEN; RYBAK, 2018). As diversas afinidades para diferentes PBPs explicam porque o meropenem exibe valores de CIM ligeiramente mais baixos do que o imipenem para algumas enterobactérias (BREILH et al., 2013). Exceto para o ertapenem, o espectro de atividade de todos os demais carbapenêmicos é similar, com pequenas diferenças na atividade entre os agentes. Assim sendo, esse subgrupo é ativo contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como para espécies anaeróbias. As exceções incluem *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus faecium* e *Enterococcus fecalis*, que não são afetados pelo imipenem, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter baumannii*

pelo ertapenem e *Stenotrophomonas maltophilia* por toda a classe (BREILH et al., 2013).

Figura 3 – Antimicrobianos beta-lactâmicos clinicamente relevantes



Estrutura química dos beta-lactâmicos de maior relevância clínica apresentando a estrutura do anel beta-lactâmico destacada pelo sombreamento em cinza

FONTE: Adaptado de Konaklieva (2014)

K. pneumoniae é capaz de adquirir resistência aos carbapenêmicos por meio de dois mecanismos principais. Um deles ocorre pela combinação da superexpressão de beta-lactamases com baixa atividade contra carbapenêmicos com a redução da permeabilidade do antimicrobiano pela membrana externa (ADLER et al., 2015; XU; SUN; MA, 2017). Essas alterações na permeabilidade podem ocorrer por deficiência quantitativa e/ou qualitativa na expressão de porinas ou pela superexpressão de bombas de efluxo (DORTET et al., 2017). As ESBL, assim denominadas pela capacidade de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro, são frequentemente relacionadas à resistência pela associação com alterações nos genes regulatórios das porinas (DORTET et al., 2017; PADMINI et al., 2017). A aquisição de genes codificadores de ESBL confere resistência contra diversos beta-lactâmicos, incluindo as cefalosporinas de terceira geração e os monobactâmicos;

entretanto, a atividade dessas enzimas pode ser reduzida por inibidores de beta-lactamases (CALBO; GARAU, 2015). Os genes de ESBL estão comumente associados a plasmídeos, os quais carregam frequentemente genes de co-resistência a outros antimicrobianos, como aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas, entre outros, caracterizando um perfil MDR nas cepas ESBL (PADMINI et al., 2017). Microrganismos MDR são definidos como aqueles que não são suscetíveis a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas (RELLO; BUNSOW; PEREZ, 2016).

Outro mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* ocorre por meio da aquisição de genes de carbapenemases (XU; SUN; MA, 2017). Esses genes codificam enzimas com alta afinidade pelos carbapenêmicos, sendo capaz de hidrolisar além desse subgrupo, quase todos os beta-lactâmicos (PADMINI et al., 2017; POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007). Valores de CIM mais elevados são reportados nas cepas resistentes a carbapenêmicos que produzem carbapenemases quando comparadas às cepas resistentes não produtoras de carbapenemases (ADLER et al., 2015). Nesse contexto, a maioria dos estudos, apesar de poucas exceções, relata maiores taxas de mortalidade entre pacientes infectados por cepas exibindo resistência pela produção de carbapenemase (XU; SUN; MA, 2017).

As beta-lactamases são enzimas periplasmáticas que se ligam e, então, hidrolisam os antimicrobianos beta-lactâmicos, impedindo que esses atinjam a molécula-alvo para desencadear seu mecanismo de ação (PAPP-WALLACE et al., 2011). De acordo com classificação proposta por Ambler, quatro classes de beta-lactamases, de A a D, são distinguidas, baseando-se em sua atividade hidrolítica e inibitória (Tabela 1) (PAPP-WALLACE et al., 2011). As enzimas das classes A, C e D possuem um mecanismo hidrolítico que utiliza resíduos de serina para desempenhar sua ação, sendo, portanto, serina-beta-lactamases; enquanto as enzimas da classe B contêm zinco em seu sítio ativo, sendo, então, denominadas de metalo-beta-lactamases (AMBLER, 1980; IOVLEVA; DOI, 2017; QUEENAN; BUSH, 2007). A classe A engloba a maior parte das beta-lactamases, incluindo as penicilinas, a maioria das ESBLs e as serina-carbapenemases (PHILIPPON; SLAMA; LABIA, 2016). As carbapenemases, por sua vez, podem ser identificadas apenas nas classes A, B e D, uma vez que na classe C estão compreendidas apenas cefalosporinas (enzimas AmpC) (CHO et al., 2018).

Tabela 1 – Visão geral das beta-lactamases, substratos, classificação e atividade inibitória

Descrição Geral (Enzimas Representativas)	Classe Molecular	Espectro de Hidrólise	Suscetível a Inibidores
Beta-lactamases de largo espectro (TEM e SHV anteriores)	A	Penicilinas, cefalosporinas das primeiras gerações	S
Beta-lactamases de espectro estendido (TEM e SHV posteriores, CTX-M)	A	Penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, aztreonam	S
Serino-carbapenemases (KPC, SME)	A	Penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, aztreonam	Variável
Metallo-beta-lactamases (NDM, VIM, IMP, SPM)	B	Todas as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos	N
Cefalosporinases (enzimas AmpC, CMY)	C	Cefalosporinas	Variável
Oxacilinas (OXA)	D	Oxacilina, cefalosporinas de amplo espectro, carbapenêmicos	Variável

FONTE: Adaptado de CHO et al., 2018

As carbapenemases do grupo A são as que apresentam maior diversidade e distribuição, sendo identificadas nas enterobactérias e em bacilos Gram-negativos não-fermentadores (VERA-LEIVA et al., 2017). Entre as carbapenemases do grupo A, o subgrupo clinicamente mais importante é o das enzimas KPC, que compreendem 23 variantes (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table 1>), com distintas propriedades cinéticas e eficiência de hidrólise dos beta-lactâmicos (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; VERA-LEIVA et al., 2017). As KPCs são as mais prevalentes carbapenemases da classe A, as quais são capazes de hidrolisar quase todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, além das cefalosporinas e do aztreonam (VERA-LEIVA et al., 2017; WALSH, 2010). Embora originalmente observado nas cepas de *K. pneumoniae*, o gene que codifica as KPCs, o *bla_{KPC}*, é encontrado em uma ampla variedade de plasmídeos com disseminação para outras enterobactérias (CERQUEIRA et al., 2017). Adicionalmente, os plasmídeos que albergam o gene *bla_{KPC}* frequentemente

carreiam outros genes de resistência a múltiplas classes antimicrobianas, tornando as opções de tratamento muito restritas e contribuindo, assim, para a alta taxa de mortalidade (CAMPOS et al., 2016; JORGENSEN; RYBAK, 2018). Entre as KPCs, as variantes KPC-2 e KPC-3 são as mais prevalentes, sendo responsáveis por surtos epidêmicos em todo o mundo, destacando-se uma maior predominância mundial da KPC-2 (VERA-LEIVA et al., 2017).

O grupo B, das metalo-beta-lactamases (MBL), compreende as carbapenemases com maior diversidade molecular, incluindo as enzimas da família IMP (*Pseudomonas* resistente a imipenem), VIM (metalo-beta-lactamase codificada por integron-Verona), SPM-1 (metalo-beta-lactamase São Paulo) e NDM (metalo-beta-lactamase Nova-Delhi). Inicialmente, as MBLs ocorriam comumente em *Pseudomonas aeruginosa* e espécies do gênero *Acinetobacter*, sendo a primeira MBL, uma IMP-1, identificada em 1990 em *P. aeruginosa*. Entretanto, mais recentemente observou-se a emergência de MBLs em Enterobacteriaceae, a qual vem se disseminando em ritmo preocupante (WALSH, 2010). A IMP-1, como a maioria das MBLs, tem um perfil de substrato muito amplo, incluindo cefalosporinas de amplo espectro (cefotaxima, ceftazidima e cefepima) e carbapenêmicos (imipenem e meropenem). Apenas os monobactâmicos não são hidrolisados por essas enzimas (POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007). As MBLs não sofrem a ação de inibidores de beta-lactamases, mas são sensíveis a agentes quelantes como o EDTA, devido à presença do átomo de zinco divalente em seu sítio alvo (JEON et al., 2015).

As beta-lactamases do grupo D são também conhecidas como oxacilinasas, e aquelas que exibem atividade de carbapenemase são majoritariamente encontradas em *Acinetobacter* spp., embora haja relatos crescentes de Enterobacteriaceae e, em particular, *K. pneumoniae* albergando genes codificadores dessas enzimas (POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007; WALSH, 2010). As carbapenemases desse grupo hidrolisam, além de penicilinas, carbapenêmicos, embora fracamente, e isoxazolilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina e dicloxacilina), característica responsável pela denominação desse grupo de oxacilinasas. Não são capazes de hidrolisar as cefalosporinas de espectro estendido e aztreonam e, são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico (JEON et al., 2015; POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007).

2.3 *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC

A resistência ao primeiro beta-lactâmico, a penicilina, em *K. pneumoniae* foi detectada no início da década de 1960, levando à identificação dos primeiros genes codificadores de beta-lactamase, *bla_{SHV-1}* e *bla_{TEM-1}*. Duas décadas depois, o primeiro gene de beta-lactamase ESBL, *bla_{SHV-2}*, foi identificado nessa mesma espécie, seguido em pouco tempo pelo gene *bla_{TEM-3}*, que constituiu uma nova variante genética de ESBL (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). Desde as primeiras identificações de ESBLs em *K. pneumoniae*, esse microrganismo tornou-se o principal e mais frequente portador dessas enzimas, com a maior variedade delas sendo produzidas pelo gênero *Klebsiella* spp. (CHONG; ITO; KAMIMURA, 2011; SCARPATE; COSSATIS, 2009). No início dos anos 80 e por mais de duas décadas, as cepas de *K. pneumoniae* abrigavam principalmente as beta-lactamases TEM e SHV, com alta ocorrência e disseminação de diversas variantes genéticas em diferentes países (CHONG; ITO; KAMIMURA, 2011). A partir dos anos 2000, devido à aquisição de plasmídeos e transposons codificando ESBLs tipo CTX-M, houve uma mudança no perfil de ESBLs presentes nessa espécie, alternando para uma dominância de cepas produtoras de CTX-M, culminando em diversos surtos hospitalares (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). Atualmente, verifica-se uma dominância mundial de bactérias produtoras de CTX-M, com distribuição prevalente nas enterobactérias, sendo a variante CTX-M-15 a mais frequente em *K. pneumoniae* (CALBO; GARAU, 2015; CHONG; SHIMODA; SHIMONO, 2018, PADMINI et al., 2017).

Nos últimos anos foram identificados grupos adicionais de genes ESBL em *K. pneumoniae*, adquiridos por meio de transferência horizontal de genes, e esses incluem os *bla_{GES}* e *bla_{SFO}* (BRADFORD, 2001; EVANS; AMYES, 2014). Atualmente, a ocorrência de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL é crescente em todo o mundo, exibindo proporções epidêmicas em muitos países, apesar de haver diferenças nas variantes predominantes entre as regiões geográficas (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). Segundo a OMS, a ocorrência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL atingiu taxas endêmicas de até 50% em muitas partes do mundo, demonstrando a natureza disseminada dessa resistência (OMS, 2014a). Em investigação epidemiológica realizada pelo SENTRY, um programa de vigilância de resistência antimicrobiana com abrangência mundial, foi detectada, no

Brasil, no ano de 2011, uma taxa de 50% de cepas produtoras de ESBL em *Klebsiella* spp. contrastando com uma taxa de 18% em *E. coli* (JONES et al., 2013). Outro estudo mais recente, realizado pelo SMART (Estudo para Monitoramento das Tendências de Resistência Antimicrobiana), no período de 2013 a 2015, foi identificada uma taxa de 42% de cepas ESBL positivas em um total de 974 amostras de *K. pneumoniae* (KARLOWSKY et al., 2017). A ocorrência endêmica de *K. pneumoniae* produtora de ESBL em várias partes do mundo é resultado de uma evolução exponencial e contínua de novas variantes alélicas de ESBL dentro dessa espécie e, também, em outras enterobactérias, adquiridas por transferência horizontal de genes contidos em elementos genéticos móveis (NAVON- VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017).

O fenótipo MDR das cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL levou a um aumento significativo na utilização de carbapenêmicos, os quais se tornaram a terapia de primeira linha para o tratamento desses patógenos (CHONG; SHIMODA; SHIMONO, 2018). O uso extensivo de carbapenêmicos resultou na evolução e na propagação das carbapenemases mediadas por plasmídeos e, assim como para a maioria dos antimicrobianos, a resistência emergiu rapidamente, seguida de uma rápida disseminação, principalmente entre bactérias Gram-negativas (MELETIS, 2016; NAVON- VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). Os genes que codificam as carbapenemases estão frequentemente contidos em plasmídeos, que conferem mobilidade a esses determinantes gênicos, facilitando a sua disseminação (POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007).

O mecanismo que mais frequentemente conduz à resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* é a produção de carbapenemase KPC (ADLER et al., 2015; VERA-LEIVA et al., 2017). Kp-KPC comumente alberga genes que conferem resistência a diversas outras classes de antimicrobianos, resultando em organismos exibindo fenótipo MDR (CALFEE, 2017). Essa classe de microrganismos foi identificada pela primeira vez em 1996 nos EUA, e desde então se tornou uma das maiores preocupações nos últimos anos, por ambos os pontos de vista: clínico e epidemiológico (RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2018; TUMBARELLO et al., 2015). Os fatores que tornam a Kp-KPC preocupante incluem suas elevadas taxas de mortalidade, seus efeitos na qualidade de vida, os altos custos hospitalares, seu potencial de propagação em nível local e global e, especialmente, seu tratamento, cujas opções disponíveis constituem fármacos causadores de efeitos adversos

graves, como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2018).

Há um amplo espectro de infecções clínicas causadas por Kp-KPC, incluindo bacteremia primária ou associada à implantação de cateter, pneumonia nosocomial, infecções do trato urinário, infecções de sítio cirúrgico e feridas, peritonite, endocardite e mediastinite (PETROSILLO et al., 2013). Entre os surtos por CRE, aqueles causados por Kp-KPC são responsáveis por taxas de mortalidade mais elevadas quando comparadas às outras enterobactérias (COJUTTI et al., 2017). Em estudo desenvolvido em 10 hospitais terciários privados do estado de São Paulo, foi constatada a presença do gene *bla_{KPC}* em 96,2% das cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos isoladas no ano de 2015 (BARTOLLETTI et al., 2016). De acordo com dois estudos publicados recentemente, a infecção causada por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos exibe mortalidade ligeiramente superior a 40% (RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2018; XU; SUN; MA, 2017). Esses valores são alarmantes se comparados, por exemplo, com a mortalidade pela infecção causada pelo vírus Ebola, que fica em torno de 50% (OMS, 2014b). Um dos estudos que estimaram a mortalidade por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, desenvolvido por Ramos-Castañeda e colaboradores (2018), ao analisar essa taxa entre diferentes países, observou o maior valor no Brasil (51,0%), o país do grupo estudado com o menor índice de desenvolvimento humano (RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2018). Existem evidências que mostram que as IRAS causadas por bactérias Gram-negativas resistentes causam aumentos de 29,3% e 23,8% nos custos de hospitalização e duração da internação hospitalar, respectivamente (MAULDIN et al., 2009), um aspecto que, associado à alta mortalidade e à falta de tratamentos seguros, situa a infecção por Kp-KPC em um problema de saúde pública que requer extrema e urgente atenção (RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2018). Considerada uma pandemia, a resistência de *K. pneumoniae* aos carbapenêmicos já está causando grande impacto na gestão de infecções associadas à assistência à saúde, um panorama que permanece em contínua expansão (LOGAN; WEINSTEIN, 2017; PETROSILLO et al., 2013).

Em face deste panorama preocupante, a OMS lançou, em maio de 2015, o Plano de Ação Global em Resistência a Antimicrobianos, enfatizando a necessidade de medidas de combate e esse fenômeno. Cinco principais objetivos foram propostos e, entre eles, encontra-se o comprometimento financeiro com

investimentos em novos medicamentos, ferramentas de diagnóstico, vacinas e outras intervenções, além da promoção de pesquisa e vigilância para ampliar o conhecimento sobre RAM. O documento também fundamentou a necessidade de esforços colaborativos entre nações, coletando e compartilhando dados a nível regional e global (OMS, 2015). Corroborando a necessidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos, capazes de sobrepor os mecanismos de resistência já desenvolvidos, a OMS divulgou em 2017 um novo documento tratando do tema. Trata-se de uma lista contendo as bactérias resistentes consideradas como patógenos de prioridade global, visando incentivar a pesquisa e o desenvolvimento de novos tratamentos eficazes contra tais organismos. As bactérias foram agrupadas de acordo com a espécie e o tipo de resistência, gerando resultados estratificados em três níveis de prioridade: crítico, alto e médio. No grupo mais alarmante – crítico – encontramos as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de 3ª geração, confirmando a urgência da necessidade de uma nova abordagem terapêutica (OMS, 2017).

2.4 Opções terapêuticas para infecções por Kp-KPC

Para os clínicos, selecionar um regime de tratamento efetivo para Kp-KPC é um grande desafio, visto que um tratamento antimicrobiano ótimo ainda não foi definido (COJUTTI et al., 2017). Atualmente, existem poucas terapias efetivas para infecções por esses microrganismos, são elas: tigeciclina, polimixinas, aminoglicosídeos e fosfomicina (CAMPOS et al., 2016). No entanto, a utilização desses agentes tem sido limitada devido a propriedades farmacocinéticas desfavoráveis e toxicidade substancial (CHO et al., 2018). A falta de novos antimicrobianos faz com que seja necessária a reavaliação de fármacos historicamente evitados na prática clínica (MORRILL et al., 2015). Esse é o caso da polimixina E, ou colistina, e da polimixina B, que apesar de exibirem neurotoxicidade e nefrotoxicidade, tornaram-se antimicrobianos de último recurso para tratar infecções potencialmente fatais por Gram-negativas MDR, como o caso da Kp-KPC (ZURFLUH et al., 2017). Outra preocupação na utilização das polimixinas é o desenvolvimento de resistência, sendo esse um fenômeno bem descrito e que tem se tornado cada vez mais comum (CALFEE, 2017; MORRILL et al., 2015). Um estudo em São Paulo relatou uma mudança nas taxas de resistência de Kp-KPC à

polimixina B, saltando de 0% em 2011 para 27,1% em 2015 (BARTOLLETTI et al., 2016). Essa elevação coincide com o aumento do uso de polimixina B para o tratamento de bacilos gram-negativos MDR (SAMPAIO; GALES, 2016).

Estratégias terapêuticas adicionais devem ser usadas sempre que possível, a fim de maximizar a probabilidade de um desfecho favorável (CALFEE, 2017). Nesse sentido, dados publicados indicam que a combinação de duas ou mais substâncias que apresentam atividade contra o isolado pode exibir menores taxas de falência terapêutica quando comparada à monoterapia, alcançando benefícios à sobrevivência do paciente (PIEDRA-CARRASCO et al., 2017; YU et al., 2017). Recentes evidências sugerem que benefícios maiores são produzidos por regimes de combinação que incluem um carbapenêmico como suporte principal, apresentando efeitos de aditividade ou sinergismo com outras substâncias (DAIKOS et al., 2014; TUMBARELLO et al., 2015). Melhores desfechos foram relatados entre pacientes que receberam terapia combinada de carbapenêmico com polimixina, particularmente em indivíduos e/ou ambientes com cepas exibindo nível de resistência aos carbapenêmicos relativamente baixo ($\text{CIM} \leq 4-16$) (DAIKOS et al., 2014; TUMBARELLO et al., 2015). Contudo, Satlin e colaboradores (2017) demonstraram que esta estratégia para pacientes infectados por *K. pneumoniae* com altos níveis de resistência aos carbapenêmicos geralmente não fornecem benefício.

Outros estudos propõem o tratamento com um regime de dois antimicrobianos carbapenêmicos, um menos enzimaticamente estável, como o ertapenem, agindo como “inibidor suicida” e poupando a hidrólise do segundo, um agente mais estável, como o meropenem, que permanece intacto para exercer seu efeito antimicrobiano (CALFEE, 2017; CPREK; GALLAGHER, 2016). Essa estratégia também parece ser mais eficaz para o tratamento de infecções causadas por organismos com CIM para carbapenêmicos relativamente baixas e menos eficaz em pacientes imunocomprometidos (CALFEE, 2017). Entretanto, muitas questões permanecem não esclarecidas sobre quais combinações utilizar e quando elas devem incluir um carbapenêmico, refletindo a necessidade de novos estudos sobre combinações antimicrobianas (LEWIS, 2016).

Em resumo, a mortalidade relacionada à infecção por Kp-KPC tem aumentado devido ao uso de medicamentos que causam efeitos adversos graves, e ao fato de que esse patógeno foi capaz de desenvolver resistência à maioria dos

medicamentos disponíveis (RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2018). Após muitos anos desde a identificação de resistência aos carbapenêmicos em Enterobacteriaceae, a ausência de novos agentes levou os clínicos a utilizar agentes antimicrobianos mais antigos e/ou combinações de fármacos clássicos; entretanto, essas estratégias exibem sucesso variável (BOWERS; HUANG, 2016). Portanto, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com atividade contra cepas de Kp-KPC e outros organismos gram-negativos com perfil de MDR é urgentemente necessário (CALFEE, 2017).

2.5 Fendiona e seus derivados

A investigação de novas opções terapêuticas tem focado no desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos, capazes de atuar contra as bactérias por meio de mecanismos diferentes das classes já empregadas na prática clínica. Nesse sentido, a 1,10-fenantrolina (fenantrolina) é um dos mais prósperos e mais extensivamente estudados ligantes heterocíclicos com ação quelante (VIGANOR et al., 2015), cujas propriedades antimicrobianas já foram demonstradas para *Candida albicans* (MCCANN et al., 2000), *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (ROY et al., 2008), *Leishmania braziliensis* (LIMA et al., 2009), *Trypanosoma cruzi* (SANTOS et al., 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (VIGANOR et al., 2015), entre outros vários microrganismos. Esse composto orgânico exibe atividade contra variada gama de microrganismos devido à sua habilidade de sequestrar metais essenciais, interferindo na aquisição desses e na sua biodisponibilidade para reações metabólicas cruciais (SANTOS et al., 2012). Como esperado, esse sequestro de elementos metálicos importantes prejudica o funcionamento de uma variedade de sistemas biológicos, ao inibir a ação de metaloproteínas e provocar perturbação na homeostase celular microbiana, culminando em várias disfunções metabólicas incluindo a morte celular (MCCANN et al., 2012b).

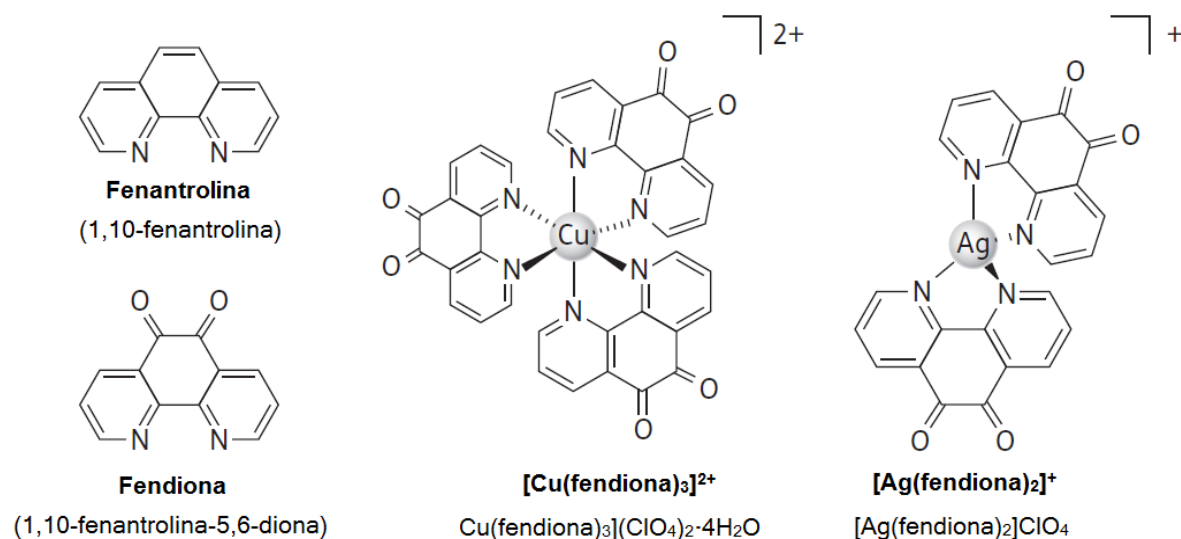
A 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), produzida por meio da derivatização da fenantrolina, com adição de dois grupos carbonila ligados nas posições 5 e 6, é reconhecida por apresentar propriedades biológicas interessantes (GRANATO et al., 2017; MCCANN et al., 2000). Além de desempenhar atividade antimicrobiana contra fungos, bactérias e parasitos, como sua precursora fenantrolina, é também descrita a capacidade de fendiona exercer efeitos antitumorais (DEEGAN et al., 2006). A

estrutura química de fendiona confere um caráter bifuncional a esse composto, tornando-o um ligante extremamente versátil, com reatividade em duas porções distintas: quinonóide e diimínica. A função quinonóide propicia capacidade de oxirredução, culminando na formação de espécies reativas de oxigênio, enquanto que a função diimínica, torna essa molécula propícia para a quelação de metais de transição (GRANATO et al., 2017; MCCANN et al., 2000). A habilidade em participar de reações de oxirredução, em adição à atividade quelante, provavelmente torna fendiona mais biologicamente ativa quando comparada à fenantrolina (MCCANN et al., 2012b). Em um estudo realizado com amostras de *E. coli* e *B. subtilis* foi demonstrado que fendiona (CIM = 2 e 0.5 µg/mL, respectivamente) apresentou atividade superior contra essas espécies em oposição à fenantrolina (CIMs = 25 e 15 µg/mL, respectivamente) (ROY et al., 2008). Em outro estudo, utilizando-se amostras de *C. albicans*, o resultado foi semelhante, de modo que fendiona (CIM = 0,6 µg/mL) apresentou atividade consideravelmente maior do que aquela desempenhada por fenantrolina (CIM = 2,5 µg/mL) (MCCANN et al., 2012b).

A ação antimicrobiana de fenantrolina e seus derivados, como fendiona, pode ser modulada por meio de alterações em suas estruturas moleculares, com a inclusão de ligantes auxiliares adequados. O desenvolvimento de substâncias pela complexação de metal com derivados da fenantrolina permite a expansão da diversidade estrutural desses compostos, controlando a sua geometria e variando os estados de oxidação de seu metal central, permitindo assim, alcançar distintas rotas bioquímicas nos microrganismos (VIGANOR et al., 2017). A coordenação de fendiona a íons prata (Ag^+) e cobre (Cu^{2+}) produzindo respectivamente $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Cu-fendiona) e $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$ (Ag-fendiona), objetivando a geração de novos complexos com atividades antimicrobiana e antitumoral ampliadas e toxicidade reduzida, originou um novo grupo de agentes antimicrobianos considerados promissores (MCCANN et al., 2004). Viganor e colaboradores (2015), em estudo com *P. aeruginosa*, observaram diferenças significativas na atividade antibacteriana de fendiona não-coordenada (média geométrica (MG)-CIM 31,15µM) em comparação com fendiona coordenada a Ag^+ e Cu^{2+} (MG-CIM 14,05 µM e 7,76 µM, respectivamente). Entretanto, em estudo realizado por Gandra e colaboradores (2017), com amostras de fungo do complexo *Candida haemulonii*, foi observada diferença considerável no efeito antimicrobiano apenas de Ag-fendiona (MG-CIM 2,16 µM) em comparação com fendiona livre (MG-

CIM 10,27 μM), enquanto que Cu-fendiona (MG-CIM 9,65 μM) exibiu atividade equivalente ao seu precursor. É importante ressaltar que nesses dois estudos mencionados, foi também demonstrada a atividade de fendiona e seus derivados coordenados a metais sobre amostras de *P. aeruginosa* (VIGANOR et al., 2015) e *C. haemulonii* (GANDRA et al., 2017) com perfis de resistência a múltiplos antimicrobianos. Assim, foi verificado um elevado potencial terapêutico desses compostos contra microrganismos resistentes, incluindo espécies de fungos e bactérias. Por fim, testes *in vivo* demonstraram que esses complexos são bem tolerados por larvas de *Galleria mellonella* e não apresentam toxicidade significativa a camundongos suíços quando administrados com até 45 mg kg⁻¹ d⁻¹, aspecto que consolida seu potencial de futura aceitação clínica (MCCANN et al., 2012a).

Figura 4 - Estruturas químicas de 1,10-fenantrolina, 1,10-fenantrolina-5,6-diona, [Cu(fendiona)₃](ClO₄)₂·4H₂O e [Ag(fendiona)₂]ClO₄



FONTE: Adaptado de Viganor et al. (2015)

2.6 Avaliação do potencial terapêutico de candidatos a fármacos antimicrobianos

Os antimicrobianos revolucionaram o campo da medicina, sendo responsáveis por salvar milhões de vidas todos os anos, seja no tratamento de infecções ou permitindo a realização de cirurgias e procedimentos médicos quando empregados com fim profilático (MARTENS; DEMAINE, 2017). Entretanto, verifica-se atualmente a perda de eficácia de grande parte dos antimicrobianos devido à evolução da resistência, o que, aliado a uma escassez no portfólio de novas terapias

antimicrobianas, conduziu a uma crise no tratamento das doenças infecciosas (MOLCHANOVA; HANSEN; FRANZYK, 2017). Nesse contexto, um grande desafio consiste em encontrar novas terapias visando o combate, principalmente, de bactérias com perfil de resistência disseminada (CZAPLEWSKI et al., 2016). Os grupos de pesquisa devem concentrar esforços em explorar novas abordagens, incluindo novas substâncias antimicrobianas com novos mecanismos de ação e novos alvos, sem provocar efeitos tóxicos no hospedeiro. Entretanto, a maioria dos antibióticos atualmente em desenvolvimento consiste em versões novas de classes já existentes, não representando, de fato, uma nova abordagem para o tratamento antibacteriano (RELLO; BUNSOW; PEREZ, 2016). Entre os anos de 2008 e 2015, a agência regulatória dos Estados Unidos, FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), aprovou 19 antimicrobianos novos, entre os quais apenas três representam os primeiros de sua classe (BUTLER; BLASKOVICH; A COOPER, 2016). Entre as razões para o reduzido número de antimicrobianos aprovados estão a dificuldade em encontrar novas fontes de substâncias com atividade antimicrobiana e as exigências regulatórias das entidades que legislam o desenvolvimento de medicamentos (RELLO; BUNSOW; PEREZ, 2016).

Especialmente para o desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos, dados microbiológicos devem ser inicialmente acumulados, gerando informações preliminares sobre os efeitos antimicrobianos e, futuramente, auxiliando as análises de farmacocinética e farmacodinâmica (PK-PD). Quando possível, a identificação de índices de PK-PD e seus alvos deve ser obtida a partir de dados não-clínicos, envolvendo o uso de modelos *in vitro* e/ou *in vivo* (ANDRADE et al., 2016; CHMP, 2016). Para a aprovação formal de um novo agente antimicrobiano, deve ser identificado o espectro de atividade do candidato a fármaco e, a partir do espectro, identificação dos tipos de infecções que podem ser tratadas por ele. Também devem ser obtidas as distribuições de CIM nos patógenos mais relevantes para as indicações pretendidas, se possível, utilizando isolados clínicos de pacientes com tipos de infecções que se enquadram nessas indicações. É importante que a avaliação da CIM seja realizada em subtipos distintos de organismos (como genótipos ou sorotipos) apresentando taxas e mecanismos de resistência variados. Posteriormente, estudos de tempo-morte devem ser executados, para evidenciar mudanças nas concentrações de microrganismos ao longo de um período de tempo especificado e justificado (CHMP, 2016).

Considerando-se o limitado número de agentes terapêuticos eficazes, várias estratégias têm sido propostas para tratar infecções por microrganismos problemáticos como a Kp-KPC. Uma das estratégias mais apoiadas é o regime de combinação de antimicrobianos, com potencial para melhorar a atividade bactericida, suprimir o surgimento de resistência e superar as deficiências farmacocinéticas dos agentes individualmente (GIANNELLA et al., 2017). A avaliação *in vitro* de sinergismo entre substâncias antimicrobianas verifica se duas ou mais dessas substâncias podem ser combinadas para a obtenção de um resultado clínico mais favorável (LAISHRAM et al., 2017). Existem quatro métodos principais pelos quais o sinergismo pode ser avaliado *in vitro*: método de *checkerboard*, ensaio de curva de tempo-morte, método com fita gradiente e ensaio antimicrobiano bactericida de múltiplas combinações, sendo os dois primeiros empregados com maior frequência (DOERN, 2014; MOLCHANOVA; HANSEN; FRANZYK, 2017). Embora muitos métodos de teste estejam disponíveis para determinar a interação entre agentes antimicrobianos, eles ainda não foram totalmente padronizados (LAISHRAM et al., 2017). Os critérios seguidos para interpretação dos resultados não estão definidos, com exceção da curva tempo-morte, que foi integralmente padronizada pelo CLSI (1999).

O ensaio de *checkerboard* se baseia na aplicação de um arranjo bidimensional de concentrações seriadas de compostos de teste, contemplando uma ampla gama de concentrações. O valor do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) é então calculado para a interpretação do resultado, que pode consistir em sinergismo, aditividade, indiferença ou antagonismo, a depender do critério de interpretação adotado (LAISHRAM et al., 2017; ODDS, 2003; PILLAI; MOELLERING; ELIOPOULOS, 2005). É importante ressaltar que sinergismo ocorre quando os dois compostos combinados produzem um efeito total superior à soma dos agentes individualmente, enquanto aditividade consiste apenas na soma dos efeitos individuais, sem que um agente afete a atividade do outro (ZHOU et al., 2016). O ensaio de curva tempo-morte é considerado como método padrão de referência para a determinação de sinergismo entre agentes antimicrobianos (LAISHRAM et al., 2017). Esse método é também o mais adequado para avaliar *in vitro* as propriedades farmacodinâmicas da interação entre os constituintes da combinação, pois revela o tempo com que as bactérias são mortas quando expostas às concentrações das substâncias (KU et al., 2017; MOLCHANOVA; HANSEN;

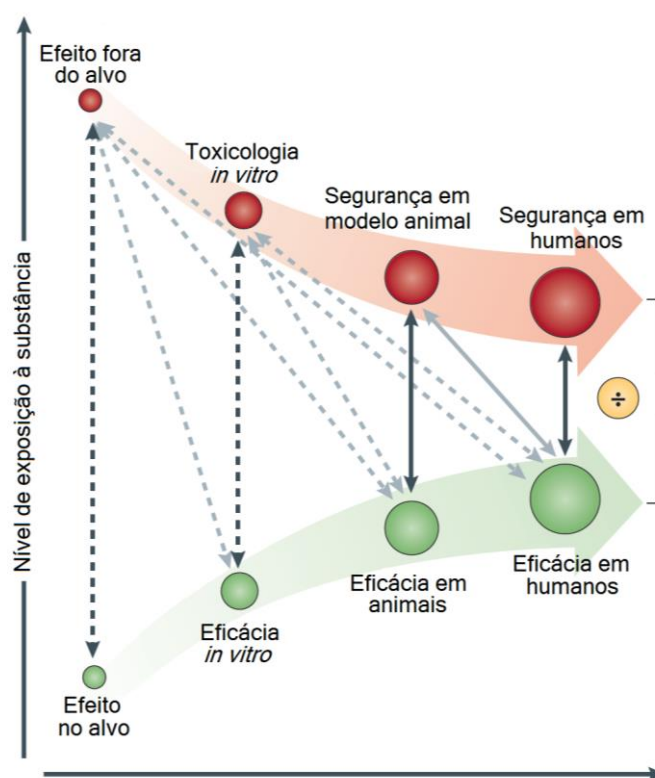
FRANZYK, 2017). Para isso, solução de inóculo da amostra testada é adicionada a soluções contendo os agentes antimicrobianos e sua combinação. Subculturas são feitas a partir desse sistema em diferentes intervalos de tempo, para os quais é feita a estimativa de contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) (CLSI, 1999; LAISHRAM et al., 2017). Este método permite testar apenas uma concentração de uma única combinação de antimicrobianos por vez, devendo ser repetido para avaliar interações em outras proporções dos agentes (LAISHRAM et al., 2017). Em resumo, o método de *checkerboard* assemelha-se ao método de determinação da CIM e fornece informações sobre quais combinações inibem o crescimento bacteriano, enquanto a curva tempo-morte é utilizada para comparar a taxa de morte bacteriana exercida por cada substância isolada e em combinação. Assim, o método de *checkerboard* é frequentemente executado com fins de triagem, ao passo que só a curva tempo-morte pode fornecer uma avaliação mais detalhada do efeito sinérgico (DOERN, 2014; MOLCHANOVA; HANSEN; FRANZYK, 2017).

Em muitos grupos de pesquisa, a potência *in vitro* está normalmente no topo da cascata de triagem e é vista como um filtro para a progressão de testes com composto, porém outros parâmetros tão importantes quanto a eficácia devem ser considerados (KWONG, 2015). Em primeiro lugar, está a segurança do candidato a medicamento, seguida de fatores secundários como farmacologia desejada, bem como a indicação clínica pretendida e as lacunas na necessidade médica. Com base nesses fatores, pode-se dar mais ou menos peso à segurança ou à eficácia de um agente, com o objetivo de alcançar um perfil de eficácia e segurança bem equilibrado e específico para cada indicação (MUELLER; MILTON, 2012). Entretanto, quando um peso muito maior é dado à efetividade de ação, adiando a investigação de indicadores de toxicidade, assume-se um risco elevado de insucesso da substância, o que contribui sobremaneira com o alto custo do desenvolvimento de medicamentos (BASS et al., 2009).

Corroborando esse cenário, é estimado que um terço dos candidatos a fármacos não aprovados sejam eliminados do processo por conta da toxicidade, contribuindo sobremaneira com o alto custo do desenvolvimento de medicamentos, particularmente quando não reconhecida até o final dos ensaios clínicos (GUENGERICH, 2011). Nesse sentido, um conceito amplamente utilizado é o de toxicidade seletiva, que representa a capacidade de um agente em causar prejuízos ao microrganismo sob concentração tolerada pelo hospedeiro (BLUMENTHAL;

GARRISON, 2011; BROOKS, 2014). Portanto, é desejado que a concentração de antibacteriano no local da infecção seja suficiente para inibir o crescimento do patógeno, ao mesmo tempo em que permaneça abaixo do nível tóxico para as células humanas. Esta relação entre a eficácia e a segurança de uma substância pode ser quantificada pelo índice terapêutico (IT), calculado com base em vários parâmetros farmacológicos e toxicológicos (MUELLER; MILTON, 2012). Variáveis substitutas preditivas (translacionais) são necessárias para estimar o IT clínico de candidatos a fármacos nos vários estágios de desenvolvimento, quando as variáveis definitivas ainda não podem ser investigadas. Os valores de ITs são reajustados e refinados durante o processo, comparando todos os dados relevantes de segurança e de eficácia disponíveis naquele momento (Figura 5).

Figura 5 – Determinação do Índice Terapêutico (IT) a partir dos dados de exposição



A extensão dos dados de segurança (indicados pelo tamanho dos círculos vermelhos na seta vermelha) e a extensão dos dados de eficácia (indicados pelo tamanho dos círculos verdes na seta verde) aumentam à medida que um candidato a fármaco progride de estudos *in vitro* para estudos em animal, e desses para estudos em humanos (indicados da esquerda para a direita na figura).

FONTE: Adaptado de Mueller e Milton (2012)

Embora o conceito pareça simples, a determinação e interpretação do IT podem ser complexas e dependem tanto do estágio de desenvolvimento (que afeta os dados disponíveis) quanto da indicação para a qual o medicamento está sendo desenvolvido. Para um medicamento aprovado em um ambiente clínico estabelecido, uma definição clássica do IT é a razão entre a dose do medicamento que causa efeitos adversos e/ou gravidade não compatível com a indicação almejada (por exemplo, dose tóxica para 50% dos indivíduos; DT_{50}) e a dose que leva ao efeito farmacológico desejado (por exemplo, dose eficaz para 50% dos indivíduos; DE_{50}), ambas em mesma incidência (XU; URBAN, 2011). Não há valor universal de IT que seja considerado suficiente ou necessário para um candidato a medicamento; no entanto, valores elevados de IT são preferíveis para que ele seja considerado como tendo um perfil de segurança favorável (MUELLER; MILTON, 2012).

2.7 *Galleria mellonella* como modelo *in vivo* para testes de suscetibilidade a antimicrobianos

No processo de desenvolvimento de um novo medicamento, uma vez verificados o potencial terapêutico e a ausência de toxicidade nos experimentos *in vitro*, faz-se necessário o emprego de um modelo de experimentação animal para iniciar as avaliações do composto *in vivo*. Estudos pré-clínicos em modelos animais são importantes para determinar a farmacocinética do composto, melhor predizer os níveis de toxicidade e identificar possíveis limitações da eficácia *in vivo*, visto que a atividade pode ser prejudicada pela ação de enzimas ou outros compostos degradantes, pela ligação a componentes do hospedeiro e outras condições fisiológicas, como o pH (DESBOIS; COOTE, 2012; MORELO; TRENTIN, 2016). Os modelos mamíferos são mais frequentemente empregados para esse fim, porém, sua utilização em ensaios envolve altos custos e tempo de experimentação elevado, além de requerer aprovação ética. Assim, a necessidade por modelos alternativos para os experimentos de triagem, eticamente mais aceitos e com baixo custo de manutenção, levou ao desenvolvimento e à introdução de modelos invertebrados, entre os quais larvas da espécie *Galleria mellonella* (DESBOIS; COOTE, 2012). Nos últimos anos, foi observado um aumento muito acentuado na utilização desse inseto como modelo experimental, especialmente para o estudo da patogenicidade e da

virulência de diversos patógenos microbianos humanos, bem como para avaliação de candidatos a novos agentes antimicrobianos. Até 2016, mais de 1000 artigos sobre esse modelo de infecção já haviam sido publicados no *PubMed*, dos quais mais de 200 apenas nos anos de 2014 e 2015, demonstrando a crescente popularidade e aceitação desse modelo (TSAI; LOH; PROFT, 2016). Atualmente, os principais fatores que contribuem para a sua ampla utilização incluem a abstenção de aprovação ética, a sua manutenção fácil e de baixo custo, não necessitando de equipamentos laboratoriais especiais e o curto ciclo de vida desses animais, tornando-os ideais para estudos de alto rendimento (DESBOIS; COOTE, 2012).

Figura 6 – Larvas de *G. mellonella* como modelo de infecção *in vivo*



FONTE: O autor (2018)

G. mellonella é um inseto da família Pyralidae da ordem Lepidoptera cujas larvas, ao contrário de outros modelos invertebrados, sobrevivem a 37°C e, portanto, permitem que as infecções sejam estudadas à temperatura em que ocorrem em humanos. Essa característica torna esse modelo adequado para a investigação de fatores de virulência microbianos regulados pela temperatura (DONAHUE, 1995; MYLONAKIS, 2008). As larvas são utilizadas para estudo em seu sexto e último instar de desenvolvimento, estágio que é alcançado após, em média, cinco semanas a partir da eclosão dos ovos (TSAI; LOH; PROFT, 2016). Elas se alimentam e

crecem até atingirem o sexto estágio, quando cessam sua alimentação e entram em processo de pupação, iniciado pela produção de um casulo de seda. Permanecem na fase de pupa por aproximadamente duas semanas e, então, evoluem à mariposa adulta, atingindo um tempo médio de sete semanas de ciclo de vida (MORELO; TRENTIN, 2016). A larva é polípode, com três pares de pernas no tórax e quatro pares de pseudopernas (do inglês *proleg*) nos segmentos abdominais, e exibe coloração creme, com variações de tonalidade ao longo do processo de desenvolvimento larval (KWADHA et al., 2017).

Infecções desencadeadas em larvas de *G. mellonella* normalmente exibem progressão consistente e índices de sobrevivência reprodutíveis, e isso pode ser atribuído, em parte, à capacidade de inocular cada larva com uma dose muito precisa de patógeno (TSAI; LOH; PROFT, 2016). A acurácia na administração do inóculo pode ser tecnicamente comprometida ou de difícil controle em outros modelos invertebrados. A injeção sistêmica de inóculo diretamente na hemocèle da larva, cavidade que contém a hemolinfa, constitui um método simples que requer treinamento mínimo (DESBOIS; COOTE, 2012; MYLONAKIS, 2008). No entanto, é recomendada a realização de experimentos em replicações independentes utilizando vários lotes de larvas, visto que pode ocorrer variação na suscetibilidade à infecção entre os diferentes lotes. Também é recomendado que haja em todos os testes dois grupos controle: um grupo de larvas completamente não manipuladas e outro grupo inoculado com placebo, frequentemente tampão fosfato-salina (PBS), para controlar o trauma físico da injeção (DESBOIS; COOTE, 2012; ACHTERMAN et al., 2011). A virulência de muitos patógenos em *G. mellonella* é condizente com a virulência destes em mamíferos, incluindo humanos, fato corroborado por numerosos estudos que demonstram patogenicidade e envolvimento de determinantes de virulência semelhantes em infecções na larva e em mamíferos (BRENNAN et al., 2002; CHAMPION et al., 2009; DESBOIS; COOTE, 2012; OLSEN et al., 2011; SLATER et al., 2011).

Apesar de os insetos terem divergido a milhões de anos dos vertebrados, decorrendo-se ao desenvolvimento de uma resposta imunitária adaptativa pelos vertebrados, a resposta imunológica inata de ambos ainda mantém notáveis semelhanças (TSAI; LOH; PROFT, 2016). As primeiras linhas de defesa de *G. mellonella* são as barreiras anatômicas, como exemplo a cutícula, que forma uma barreira física composta por quitina, e as barreiras fisiológicas, como a baixa

umidade e a falta de nutrientes dentro da traqueia, criando condições desfavoráveis para a colonização por microrganismos (WOJDA, 2016). Uma vez vencidas as barreiras anatômicas e fisiológicas, esses insetos lançam mão da sua resposta imunitária inata, compreendida em duas partes: a resposta imunitária celular e a humoral. A resposta celular é mediada por células fagocitárias, denominadas hemócitos, os quais são encontrados na hemolinfa, que funciona de forma análoga ao sangue de mamíferos. Essas células são capazes de engolfar invasores no processo de fagocitose ou capturá-los em estruturas multicelulares chamadas nódulos ou cápsulas (KAVANAGH; REEVES, 2004; TSAI; LOH; PROFT, 2016). A resposta humoral envolve a síntese de moléculas de defesa efetoras que podem imobilizar ou matar o patógeno, incluindo intermediários reativos de oxigênio e de nitrogênio e peptídeos antimicrobianos (AMPs), que possuem propriedades antibacterianas e/ou antifúngicas (BROWN et al., 2009; WOJDA, 2016). Ainda sobre a resposta humoral, são produzidas diversas proteínas plasmáticas que atuam como opsoninas, reconhecendo e se ligando a componentes microbianos conservados, de forma semelhante aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) em mamíferos (TSAI; LOH; PROFT, 2016). Algumas dessas moléculas podem ser sintetizadas constitutivamente por diferentes tecidos, enquanto outras podem ser lançadas na hemolinfa em resposta à infecção (WOJDA, 2016). Hemócitos ativados desencadeiam uma reação de melanização, que resulta no revestimento do patógeno pela deposição de melanina, seguida de coagulação da hemolinfa e opsonização, processo análogo à formação de abscesso em infecções de mamíferos (TANG, 2009; WAND et al., 2013). A formação de melanina é catalisada pela enzima fenoloxidase (PO), produzida como o zimogênio pró-fenoloxidase inativo (ProPO) nos hemócitos. O ProPO é uma importante proteína constituinte da imunidade inata, considerando seu envolvimento em ambas as respostas celular e humoral (LU et al., 2014).

A atividade de agentes antimicrobianos pode ser avaliada contra qualquer patógeno ao qual a larva de *G. mellonella* seja suscetível, tendo em conta a correlação da resposta imunológica inata desse inseto com a de mamíferos. Além de valiosa informação sobre a eficácia *in vivo* do agente em desenvolvimento, esse modelo também fornece a oportunidade de identificar quaisquer efeitos tóxicos associados à administração de um composto antimicrobiano concomitante ao curso da infecção, o que não é possível por metodologias *in vitro* (DESBOIS; COOTE,

2012). Por essa razão, *G. mellonella* é um modelo considerado simples, altamente versátil e com excelente custo-benefício para avaliação rápida da eficácia de novos agentes antimicrobianos e novas combinações terapêuticas, sendo cada vez mais usado para esse fim (DONG et al., 2017; MEIR; GROSFELD; BARKAN, 2018; NATH et al., 2018; PELEG et al., 2009; YANG et al., 2018). Entretanto, é importante considerar algumas limitações que envolvem a ampla utilização desse modelo, como a limitada disponibilidade de informações sobre o seu genoma, que ainda não foi completamente sequenciado. Outro fator limitante consiste na ausência de padronização das condições de reprodução, manutenção e tratamento desses animais, o que pode influenciar sua suscetibilidade a infecções, gerando diferenças nas taxas de mortalidade após infecção por patógenos (TSAI; LOH; PROFT, 2016). Muito provavelmente, é apenas uma questão de tempo até que esses problemas sejam contornados, o que tornará *G. mellonella* um modelo de infecção ainda mais poderoso e confiável, embora seja um consenso que não seja capaz de substituir os modelos mamíferos (TSAI; LOH; PROFT, 2016). O emprego desse modelo pode servir como um teste de pré-triagem adicional, visando a redução do número de substâncias antimicrobianas que, mesmo apresentando bom desempenho em estudos *in vitro*, progridem para um desempenho malsucedido em modelo mamífero. Concomitantemente, fornece maior justificativa para testes em mamíferos, após confirmação de eficácia da substância nesse inseto (TSAI; LOH; PROFT, 2016). Assim, um aumento no emprego de tal modelo faz-se primordial para limitar o número de mamíferos utilizados em pesquisas científicas e também para reduzir os custos associados ao processo de desenvolvimento de medicamentos. (DESBOIS; COOTE, 2012).

3 JUSTIFICATIVA

Infecções causadas por microrganismos MDR, especialmente as enterobactérias produtoras de ESBL e as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (CRE), constituem um dos maiores problemas da comunidade médica atualmente, visto que são associadas a morbidade e mortalidade consideravelmente elevadas. As CRE e, entre elas, especialmente as Kp-KPC, representam um desafio para a saúde pública em todo o mundo. As Kp-KPCs são comumente resistentes a todos os agentes beta-lactâmicos e, frequentemente, possuem mecanismos de resistência adicionais a outras classes de antimicrobianos, por vezes não respondendo a nenhum agente conhecido. Estudos recentes têm focado na combinação de dois ou mais antimicrobianos como uma alternativa de tratamento para Kp-KPC, observando menores taxas de falência terapêutica quando comparada à monoterapia. Assim, a associação sinérgica de novas substâncias com antimicrobianos empregados na prática clínica pode ser uma via promissora de obtenção rápida de novas formulações terapêuticas eficazes. A fendiona, tanto em seu estado livre, quanto coordenada a íons metálicos, tem demonstrado propriedades biológicas interessantes, exercendo atividade além de antimicrobiana, também antitumoral. Considerando as propriedades antimicrobianas demonstradas por fendiona e seus derivados, perspectivas favoráveis subsistem na possibilidade desses compostos, sozinhos ou combinados a carbapenêmicos, exibirem atividade contra Kp-KPC com fenótipo MDR. Resultados anteriores do nosso grupo de trabalho, avaliando a atividade desses compostos sobre infecção por *P. aeruginosa*, projetam perspectivas favoráveis em nosso estudo, sendo o primeiro a avaliar os efeitos de fendiona e seus complexos com cobre $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e prata $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$ sobre a espécie *K. pneumoniae*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) e seus derivados metálicos ($[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$) sozinhos e combinados a carbapenêmicos em diferentes amostras *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase.

4.2 Objetivos Específicos:

- 1) Avaliar a atividade antimicrobiana de fendiona e seus derivados em amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase KPC;
- 2) Investigar a presença de efeito sinérgico entre carbapenêmicos e fendiona e seus derivados por meio de testes *in vitro* em amostras de *K. pneumoniae*;
- 3) Verificar *in vivo* os efeitos de combinações determinadas *in vitro* como sinérgicas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostras bacterianas

Um total de 46 amostras de *K. pneumoniae* carreadoras do gene *bla_{KPC}* (KPC positivas), extraídas de diversos sítios anatômicos de pacientes provenientes de hospitais da grande Vitória, Espírito Santo, no ano de 2014, foram selecionadas para o presente estudo. Essas amostras foram cedidas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo (LACEN-ES) e os procedimentos éticos cabíveis encontram-se descritos no projeto intitulado “Epidemiologia molecular e investigação dos genes de resistência em bactérias multirresistentes isoladas em hospitais da grande Vitória”, aprovado no edital FAPES/CNPq/MS-Decit/SESA nº 10/2013 – PPSUS e coordenado pelo Dr. Ricardo Pinto Schuenck (UFES).

As amostras foram obtidas a partir dos seguintes espécimes clínicos: sangue (28,26% $n=13$), urina (26,1%; $n=12$), ponta de cateter (13%; $n=6$), secreção traqueal (6,52%; $n=3$), secreção de ferida (6,52%; $n=3$), swab retal (6,52%; $n=3$), secreção de abscesso (4,35%; $n=2$), swab nasal (2,17% $n=1$), líquido peritoneal (2,17%; $n=1$), secreção abdominal (2,17%; $n=1$), fragmento ósseo (2,17%; $n=1$). Todas as amostras bacterianas foram armazenadas em caldo triptona de soja (TSB) (BD Difco™) com glicerol a 20% e estocadas a -20°C.

As 46 amostras apresentam diversos genes de resistência a beta-lactâmicos, em adição ao *bla_{KPC}* (Anexo A), com diferentes perfis fenotípicos de suscetibilidade aos carbapenêmicos, e distribuem-se entre 15 pulsotipos distintos (BORGHI, 2017).

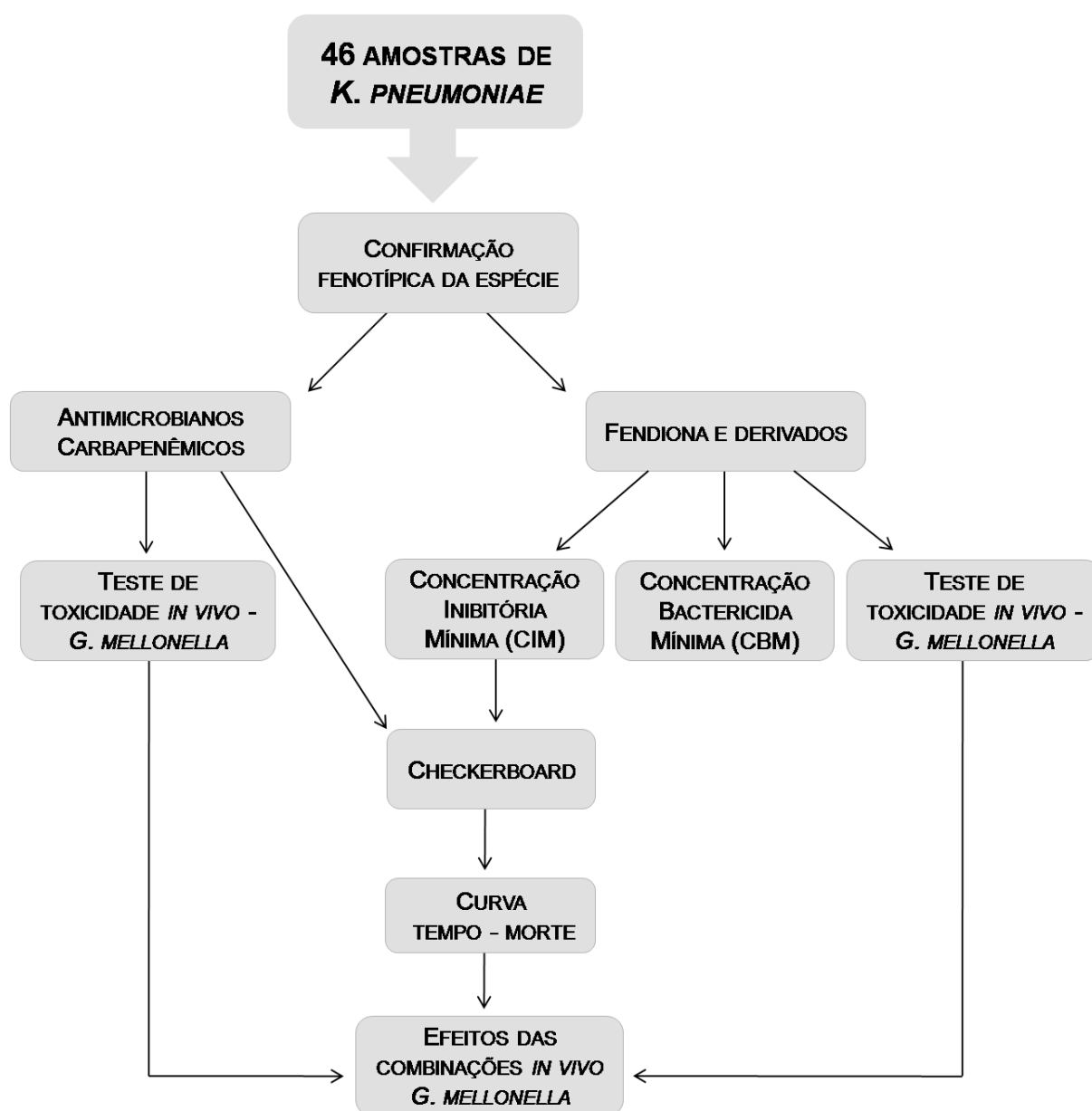
5.2 Compostos

Os compostos 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona); $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Cu-fendiona) e $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$ (Ag-fendiona) foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Dr. Malachy McCann (National University of Ireland Maynooth, Irlanda). Os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de 100 mM (solução estoque) e acondicionados à -20°C. Os sais AgNO_3 (Sigma-Aldrich®) e CuSO_4 (Sigma-Aldrich®), utilizados como controle, foram acondicionados à temperatura ambiente e mantidos em sua forma sólida até a utilização.

5.3 Delineamento Experimental

Os experimentos foram selecionados visando a obtenção de resultados relativos à atividade antimicrobiana de fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona sozinhos e em combinação aos carbapenêmicos IMP e MPM, conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma dos experimentos selecionados para a avaliação da atividade antimicrobiana de fendiona e seus derivados de forma isolada e combinada a carbapenêmicos em 46 amostras de *K. pneumoniae*



5.4 Identificação fenotípica

Para confirmação da espécie *K. pneumoniae*, as amostras foram retiradas do banco de microrganismos em glicerol a 20% e estocadas a -20°C, semeadas em ágar MacConkey (Himedia®) e incubadas em aerobiose a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 h. A confirmação da espécie bacteriana foi realizada por meio da observação morfológica das colônias, da avaliação morfotintorial pelo método de Gram e do perfil bioquímico por meio dos testes preconizados por Koneman e colaboradores (2008) para identificação primária de *Klebsiella* spp. Desta forma, foram realizados os testes de descarboxilação da lisina, motilidade e indol em meio mili (Newprov®), fermentação da glicose, fermentação de lactose e/ou sacarose e produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) (BD Difco™), metabolização do citrato em meio Citrato de Simmons (Himedia®) e produção da enzima urease em Caldo de Teste de Urease (BD Difco™).

5.5 Efeitos de fendiona e seus derivados sobre o crescimento das amostras de *K. pneumoniae*

5.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima

A CIM dos compostos fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com VIGANOR e colaboradores (2014), utilizando-se placa de microtitulação de 96 poços com caldo Mueller Hinton cation ajustado (MHB-ca) (BD Difco™) contendo diferentes concentrações dos compostos na faixa de 1,56 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (partindo de uma solução 100 mM em DMSO). As concentrações-alvo dos compostos foram obtidas diluindo-se os mesmos em MHB-ca para obter a maior concentração (100 $\mu\text{g/mL}$), seguindo-se de diluição seriada para atingir as demais. A suspensão bacteriana foi preparada a partir de cultura pura das amostras em ágar nutriente (AN) obtida com 18-24h de incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Assim, colônias foram suspensas em salina estéril e ajustadas até a obtenção de turvação similar a do padrão 0,5 da escala de McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Essa suspensão foi diluída para obtenção de um inóculo final com aproximadamente 10^5 UFC/mL em cada poço. A leitura foi realizada após incubação por 18-24h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A menor concentração de cada composto que inibiu o crescimento bacteriano, como verificado pela ausência de

turbidez visível em cada poço, foi considerada a CIM. Utilizaram-se como controles poços contendo MHB-ca mais suspensão bacteriana, MHB-ca mais soluções de composto de teste e MHB-ca sozinho. A CIM dos sais $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e AgNO_3 também foi determinada segundo VIGANOR e colaboradores (2014), a fim de confirmar a atividade antimicrobiana dos complexos. A determinação da CIM dos compostos e dos sais foi realizada em triplicata.

5.5.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

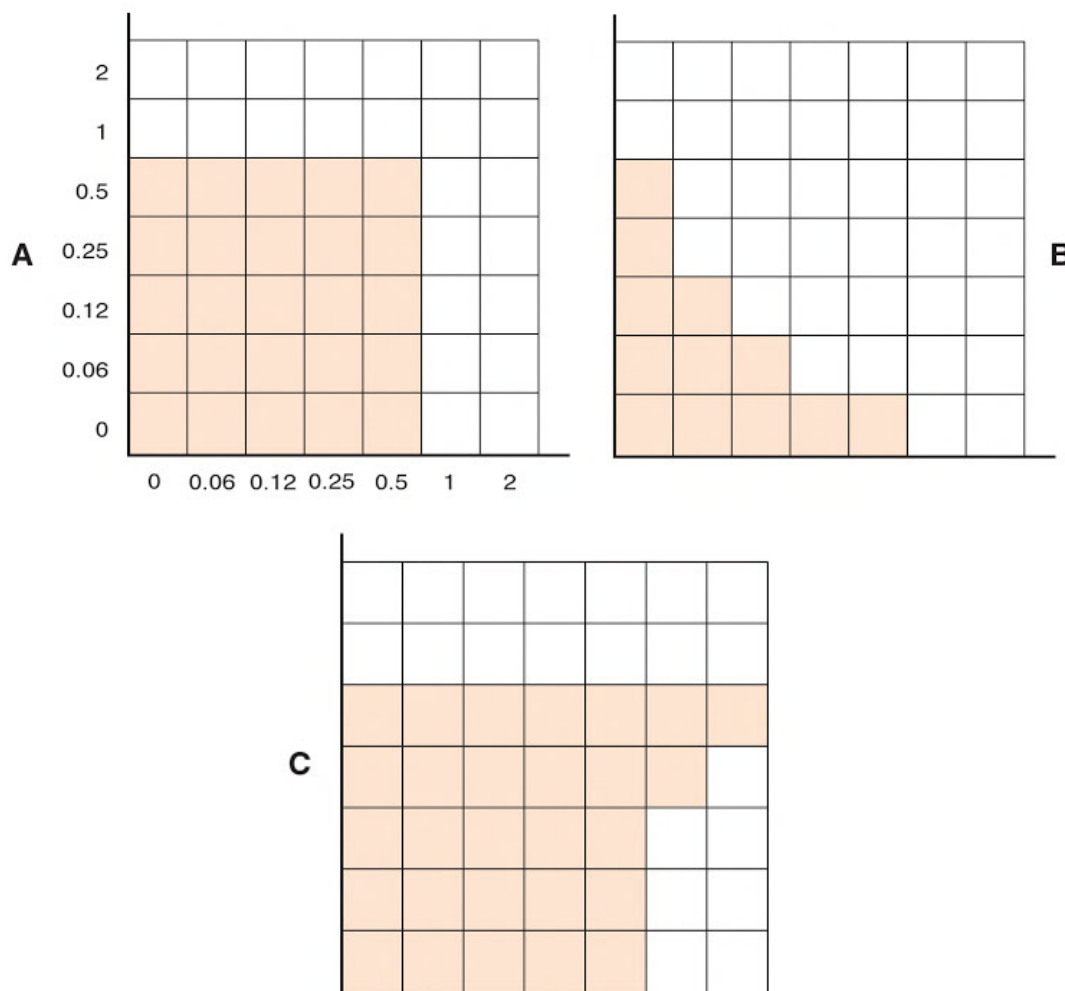
A CBM dos compostos fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona foi determinada a partir dos poços nos quais não houve crescimento bacteriano visível nas microplacas empregadas na determinação da CIM, conforme metodologia descrita no item anterior. Para isso, uma alíquota de 10 μL foi coletada de cada poço até quatro diluições a partir da CIM e, em seguida, inoculada na superfície de ágar Mueller-Hinton (MHA). As placas foram inspecionadas para a presença de algum crescimento após 18-24h de incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A CBM foi considerada como a menor concentração de cada composto em que não houve crescimento de colônias bacterianas (CLSI, 1999).

5.6 Efeitos de fendiona e seus derivados combinados a carbapenêmicos sobre o crescimento das amostras de *Klebsiella pneumoniae*

5.6.1 Método *Checkerboard*

A associação de fendiona e seus derivados ao IMP e ao MPM foi testada a partir do método de *checkerboard* visando a detecção de um possível efeito sinérgico entre eles. Seis combinações foram testadas, e essas consistiram em: MPM x fendiona, MPM x Cu-fendiona, MPM x Ag-fendiona, IMP x fendiona, IMP x Cu-fendiona e IMP x Ag-fendiona. O teste foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços contendo concentrações do antimicrobiano e do composto sozinhos e em combinação, segundo Silva (2014). O composto, nas concentrações de $\frac{1}{4} \times \text{CIM}$ a $4 \times \text{CIM}$, foi disposto em colunas e o antimicrobiano, nas concentrações de $\frac{1}{8} \times \text{CIM}$ a $4 \times \text{CIM}$, disposto em fileiras, de forma a combinarem entre si (Figura 8). As diluições dos compostos e dos antimicrobianos foram preparadas em caldo MHB-ca.

Figura 8 - Avaliação de combinações antimicrobianas pelo método de *checkerboard* evidenciando o esquema empregado nas placas de microtitulação com simulação de resultados



Os painéis A, B e C mostram possíveis resultados do teste de combinações de duas substâncias diluídas ao longo dos eixos x e y, a substância A ao longo do eixo x e a substância B ao longo do eixo y. O sombreamento indica crescimento visível e as concentrações são expressas como múltiplos da concentração inibitória mínima. **A**, Indiferença; **B**, Sinergismo; **C**, Antagonismo.

FONTE: Adaptado de Mahon, Lehman e Manuselis (2015)

A suspensão bacteriana foi padronizada a partir de uma cultura de 24 h, incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, em AN, diluindo-se em solução salina estéril a 0,85% até atingir turvação semelhante à suspensão do padrão 0,5 da escala de McFarland. Depois foi diluída em MHB-ca para obter-se um inóculo final de 10^5 UFC/mL na microplaca. Após a inoculação, a microplaca foi incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h e, então, prosseguiu-se com a leitura. O índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) foi obtido para permitir a avaliação da interação entre os diferentes tratamentos, seguindo a fórmula: $\text{CIF A} + \text{CIF B}$, onde o CIF A equivale a CIM da substância A em combinação dividido pelo CIM da substância sozinha, e CIF B

equivale ao CIM da substância B em combinação dividido pelo CIM da substância B sozinha. O ICIF foi interpretado da seguinte forma: sinergismo foi definido como um $ICIF \leq 0,5$; aditividade foi definida como $ICIF > 0,5$ a $< 2,0$; indiferença foi definida como $ICIF \geq 2,0$ a < 4 e antagonismo foi definido como $ICIF \geq 4,0$ (PILLAI; MOLLERING; ELIOPOULOS, 2005).

5.6.2 Curva de tempo-morte

Este experimento foi realizado, segundo Zhou e colaboradores (2013) com modificações, visando a avaliação de parâmetros farmacodinâmicos exibidos por combinações sinérgicas de MPM com Cu-fendiona e MPM com Ag-fendiona. Para tal, foram dispostas na microplaca soluções de MPM e composto, sozinhos e combinados entre si, diluídos em MHB-ca, atingindo as concentrações determinadas em um volume final nos poços de 200 μL . Suspensão de cada amostra foi padronizada a partir de uma cultura de 24 h incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, em AN, diluindo-se em solução salina estéril a 0,85% até atingir turvação semelhante à suspensão do padrão 0,5 da escala de McFarland. Depois foi diluída em MHB-ca para obter-se um inóculo final de 10^6 UFC/mL na microplaca. Poços contendo MHB-ca e bactéria foram utilizados como controle. A microplaca foi incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h, e em tempos fixos de 0, 3, 6, 9, 12 e 24h, 10 μL de cada cultura foram retirados e diluídos em 90 μL de solução salina estéril 0,85%. O volume total de 100 μL , correspondente ao inóculo $\times 10^{-1}$, foi diluído novamente em escala de 1:10 (v/v), originando 1000 μL de uma suspensão correspondente ao inóculo $\times 10^{-2}$, a qual foi diluída seriadamente a partir de então. Por fim, três alíquotas de 20 μL de cada diluição, a partir da diluição de 10^{-2} , foram semeadas em MHA, por meio da técnica de microgota proposta por Romeiro (2007) com modificações. Cada alíquota (20 μL) foi depositada, na forma de gota, sobre a superfície do meio de cultura em temperatura ambiente e gentilmente espalhada com movimentos circulares. Após incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por até 24h as UFCs foram contadas, sendo considerados como ideais para contagem números entre cinco e 60 colônias por microgota. O número final de colônias foi obtido pela média aritmética das três repetições e os resultados foram representados graficamente com valores de $\log_{10}$ de UFC viáveis por mL em função do tempo. A técnica de contagem de UFC por microgota foi empregada após

avaliação preliminar da sua acurácia em comparação com o método mais amplamente difundido na prática laboratorial, o *spread-plate* (SANDERS, 2012).

As contagens de UFC viáveis obtidas de cada tratamento foram representadas graficamente em função do tempo, permitindo a análise comparativa dos efeitos. A atividade foi estabelecida como sinérgica quando houve uma diminuição de pelo menos 2 log₁₀ na contagem de UFC/mL das amostras sob ação da combinação antimicrobiana, quando comparada com seu constituinte mais ativo em um tempo determinado (CLSI, 1999).

5.7 Efeitos de fendiona e seus derivados sozinhos ou em combinação a carbapenêmicos em modelo *in vivo* de *G. mellonella*

5.7.1 Criação e manutenção das larvas de *G. mellonella*

Todas as larvas utilizadas foram criadas e mantidas no Laboratório de Resistência Bacteriana (RESBAC) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), de acordo com protocolo descrito por Ramarao e colaboradores (2012) com modificações. Assim, as larvas de *G. mellonella* permaneciam no interior de potes plásticos opacos, fechados por tampa contendo furos, até o momento de sua utilização nos testes. Para a manutenção, os potes eram limpos três vezes por semana, havendo a troca do papel do fundo para evitar a proliferação de fungos e a adição de dieta específica. A dieta artificial consistia em: 200 g de farelo de trigo, 100 g de gérmen de trigo, 100 g de leite em pó, 100 mL de mel e 120 mL de glicerina. As larvas não manipuladas para experimentação desenvolviam-se em pupas e, consecutivamente, em mariposas, as quais eram coletadas dos potes plásticos e transferidas para potes de vidro tampados com papéis para onde os ovos eram transpostos. Uma vez ocorrida a ovoposição, os papéis com os ovos eram coletados, posteriormente, cortados em pedaços menores e transferidos para uma bandeja forrada com papel Whatman umedecido em água destilada e incubados a 25 °C por 24h para a eclosão dos ovos. Após esse período, iniciava-se a montagem de novos potes, em que os papéis contendo as larvas recém eclodidas eram dispostos entre duas camadas de dieta fresca.

Para todos os testes, foram coletadas larvas de *G. mellonella* em seu último instar de desenvolvimento, apresentando peso de aproximadamente 250 a 350 mg e tamanho conveniente para manipulação (20-30mm).

5.7.2 Teste de toxicidade *in vivo* de fendiona e seus derivados e do meropenem

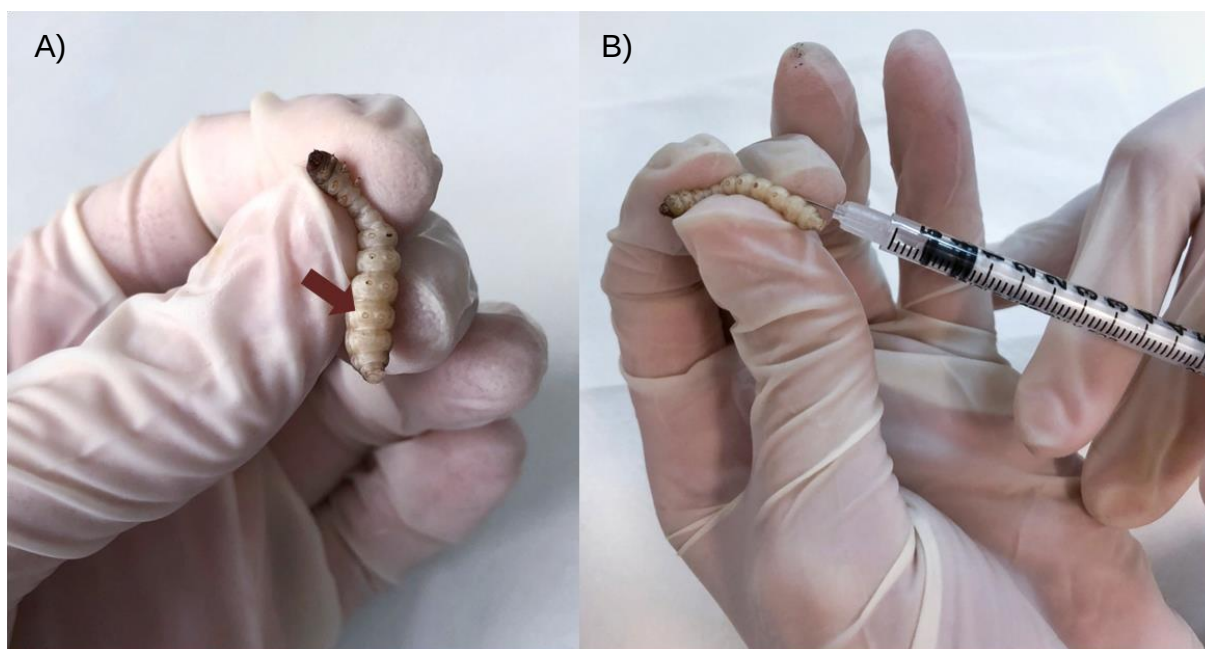
Os compostos fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona, bem como o antimicrobiano MPM foram testados nas larvas de *G. mellonella*, de acordo com a metodologia descrita por VIGANOR e colaboradores (2014), para verificar o nível de toxicidade provocada neste modelo animal. Para isso foram injetados através de seringa de insulina diretamente na hemocèle das larvas 10 µL dos compostos nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 µg/mL e do MPM nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL. Considerando-se o volume de solução injetado, as concentrações de compostos administradas às larvas correspondem a 0,5, 1, 2 e 4 µg de composto por larva. E considerando uma média de peso das larvas de 300 mg, as concentrações administradas correspondem a 1,67, 3,33, 6,67 e 13,33 mg/kg do animal. O controle negativo consistiu em PBS estéril. As larvas foram dispostas em placas de Petri contendo discos de papel Whatman e incubadas a 37°C no escuro, sendo monitoradas quanto à pigmentação e morte a cada 24h durante 96h. Foram consideradas mortas as larvas que não responderam após estímulo de toque.

5.7.3 Infecção e índice de sobrevivência

Os procedimentos de infecção larval foram realizados de acordo com o protocolo descrito por Ramarao e colaboradores (2012), em que 10 µL de inóculo de *K. pneumoniae* em três concentrações distintas (10^8 , 10^7 e 10^6 UFC/mL) foram injetados diretamente na hemocèle das larvas através de uma abertura na base do último par de pseudo-pés, utilizando seringa de insulina (Uniqmed®) (Figura 9). A solução de inóculo foi obtida por meio da seleção de três a cinco colônias de mesmo tipo morfológico a partir da cultura em AN, as quais foram tocadas com alça estéril e, em seguida, transferidas para um tubo contendo caldo TSB. Após incubação por aproximadamente 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, três alíquotas de 200 µL da cultura foram transferidas para placa de microtitulação e levadas ao espectrofotômetro (Thermoplate TP-READER®) para medição da densidade ótica (D.O.) em comprimento de onda de 630nm. A turbidez da cultura em crescimento ativo foi

ajustada adicionando-se caldo estéril até a obtenção de uma suspensão contendo aproximadamente 10^8 UFC/mL, dada por leitura de D.O. entre 0,08 e 0,1. Da suspensão ajustada foi retirada uma alíquota de 1 mL, a qual foi adicionada a microtubo e levada a centrifugação a $9520 \times g$ por 5 min. Em seguida, o caldo foi retirado do microtubo centrifugado, restando apenas o precipitado de alta densidade (pellet), o qual foi novamente suspenso em 1 mL de PBS. A partir de diluição seriada dessa última suspensão, as concentrações de inóculo empregadas nos testes foram obtidas.

Figura 9 - Inoculação em larvas de *Galleria mellonella*



A) Seta indicando o último par de pseudo-pés; B) Inoculação com seringa de insulina.

FONTE: O autor (2018)

A metodologia para a obtenção da suspensão de inóculo bacteriano foi previamente padronizada por meio da obtenção das curvas de crescimento das amostras testadas, a fim de garantir que fossem utilizadas culturas em fase exponencial de crescimento. Dessa forma, ficou estabelecida a incubação da cultura em caldo TSB por 2 h. Também previamente aos testes, foi verificada a correspondência da leitura de DO entre 0,08 e 0,1 em comprimento de onda de 630 nm com a concentração de inóculo desejada. Assim, foram semeadas alíquotas de 20 μ L das diferentes concentrações de inóculo, de acordo com a técnica de microgota, e após incubação por 18-24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, procedeu-se a contagem das

UFCs. Os resultados obtidos indicaram confiabilidade para o método estabelecido (medição de DO).

Os controles negativos dos experimentos consistiram em 10 larvas não inoculadas e 20 larvas inoculadas com 10 µL de solução PBS estéril. As larvas foram dispostas em placas de Petri contendo discos de papel Whatman e, então, incubadas a 37°C no escuro, sendo individualmente monitoradas em relação à pigmentação e morte em intervalos de 1, 2, 3, 4, 24 e 48 h após a infecção. Esse experimento foi realizado a fim de determinar a concentração de inóculo a ser empregada nos experimentos posteriores, em que foram testadas as combinações antimicrobianas nas larvas com injeção do tratamento 30 min após a infecção larvar. Para tal, buscou-se garantir a sobrevivência das larvas em pelo menos 4 h pós-infecção e elevada mortalidade em 48 h pós-infecção.

5.7.4 Avaliação dos efeitos das combinações antimicrobianas em modelo de infecção de *G. mellonella*

Os testes foram conduzidos de acordo com o proposto por Benthall e colaboradores (2015). Larvas de *G. mellonella* foram inoculadas com suspensão bacteriana em concentração determinada para cada amostra a partir dos resultados do teste de infecção e índice de sobrevivência. As suspensões foram preparadas segundo metodologia descrita no item 5.7.3. Após 30 min, tratamento antimicrobiano ou PBS (controle) foram administrados às larvas infectadas. Os tratamentos consistiram em doses subinibitórias de Cu-fendiona e MPM, sozinhos e combinados entre si, diluídos em PBS. Um segundo controle foi empregado e consistiu em grupo de larvas inoculadas duas vezes com PBS estéril com intervalo de 30 min entre as inoculações. As larvas foram então dispostas em placas de Petri contendo discos de papel Whatman e incubadas a 37°C no escuro, sendo monitoradas quanto à pigmentação e morte a cada 24h durante 96h. Os índices de sobrevivência foram comparados entre os grupos testados: infecção na ausência de tratamento, tratamento apenas com o composto, tratamento apenas com MPM e tratamento com a combinação desses.

5.8 Estatísticas e correlações

Para a avaliação da atividade antimicrobiana de fendiona e seus derivados, aplicou-se estatística descritiva a partir dos valores de CIM e CBM obtidos. Foram calculadas as concentrações necessárias para inibir o crescimento de 50% e 90% das amostras, CIM₅₀ e CIM₉₀ respectivamente, e a média geométrica de todos os valores de CIM (MG-CIM). Segundo Manikandan (2011), a MG-CIM é uma medida apropriada para demonstrar resultados de conjuntos de números cujos valores mudam exponencialmente, uma vez que indica a tendência central desses valores. Portanto, essa medida reflete de forma mais realista os resultados de CIM (DAVIES, 1990), uma vez que considera a quantidade de amostras em cada concentração. Foram calculadas também a CBM₅₀, a CBM₉₀ e a MG-CBM. Todas as medidas obtidas foram, posteriormente, convertidas a seus valores de molaridade, baseando-se em suas massas molares: fendiona = 210,19 g/mol; Cu-fendiona = 965,02 g/mol; Ag-fendiona = 627,7 g/mol; CuSO₄ = 159,609 g/mol e AgNO₃ = 169,87 g/mol.

Para a avaliação dos efeitos da associação de fendiona e seus derivados a carbapenêmicos pelo método de *Checkerboard* aplicou-se estatística inferencial, comparando os valores de ICIF entre as seis combinações. Para tal, foi realizada a análise de variâncias (ANOVA) para dados paramétricos ou do Teste Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk para avaliar a necessidade de transformação e para determinar a aplicação de teste paramétrico ou não-paramétrico. Também foi verificada a homocedasticidade dos resultados por meio do Teste de Levene, a fim de estabelecer o teste a *posteriori* adequado.

Todos os testes envolvendo a inoculação da bactéria em *G. mellonella* foram realizados em triplicata biológica e experimental ($n = 20$ larvas para cada réplica), sendo consideradas apenas as réplicas em que a mortalidade dos grupos controle foi inferior a 5%. Os resultados dos três experimentos independentes foram combinados e a curva de sobrevivência calculada utilizando o método *Kaplan-Meier*. As diferenças entre as curvas foram calculadas com o teste de Log rank.

Para todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância estatística de 95% ($p < 0,05$) e o programa utilizado para geração dos dados foi o *GraphPad Prism7*.

6 RESULTADOS

6.1 Identificação fenotípica

As 46 amostras selecionadas para este estudo apresentaram resultados compatíveis com a espécie *K. pneumoniae*: bacilos Gram negativos pela coloração de Gram; crescimento em ágar MacConkey como colônias arredondadas e mucoides com coloração rósea (lactose positiva); resultado positivo para o teste de fermentação de glicose, lactose e/ou sacarose com produção de CO₂ e ausência de formação de H₂S no TSI; resultado positivo para metabolização do citrato, descarboxilação da lisina e produção de urease e reação negativa nos testes de motilidade e indol.

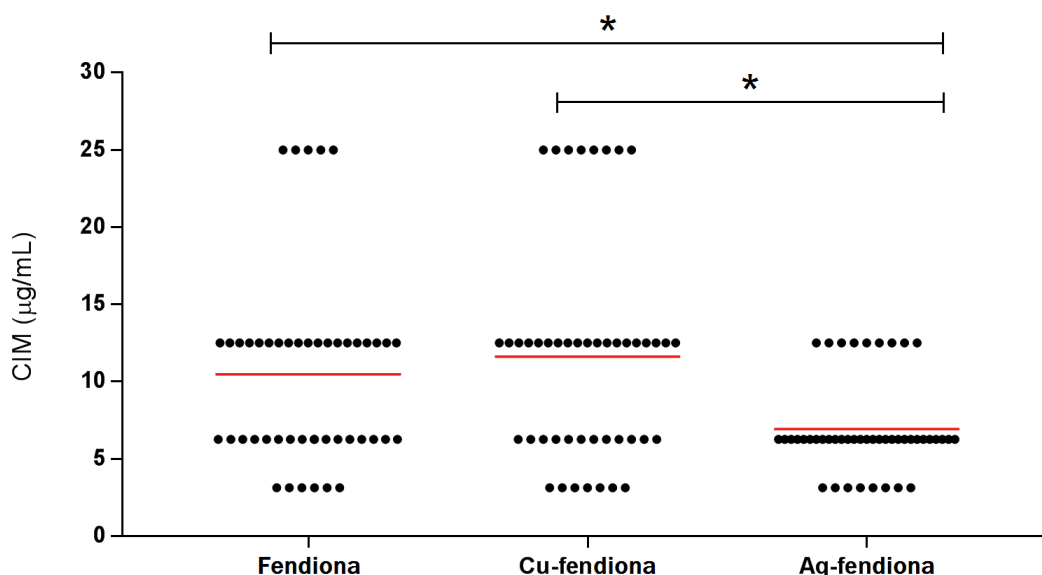
6.2 Efeitos de fendiona e seus derivados sobre o crescimento das amostras de *K. pneumoniae*

6.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima

As 46 amostras foram avaliadas em relação aos efeitos inibitórios dos três compostos estudados. Os valores de CIM para fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona de cada amostra estão demonstrados na Figura 10. Com o intuito de confirmar se o efeito observado foi decorrente da ação dos complexos, e não dos íons Ag⁺ e Cu²⁺, a atividade antibacteriana do sal de cobre (CuSO₄·5H₂O) e do sal de prata (AgNO₃) também foi avaliada. Para esse teste foram selecionadas nove amostras de *K. pneumoniae* clonalmente não relacionadas (46B, 105B e 116B isoladas de sangue, 5B e 51B de swab retal; 89B e 91B de ponta de catéter; 33B de urina e 47B de aspirado traqueal). Na Tabela 2 estão representadas as faixas de variação de CIM encontradas, os valores correspondentes às CIMs capazes de inibir o crescimento de 50% e 90% das amostras testadas, CIM₅₀ e CIM₉₀, e as médias geométricas das CIMs, MG-CIM, para fendiona, Cu-fendiona, Ag-fendiona, CuSO₄ e AgNO₃. Cu-fendiona foi o composto que apresentou o menor valor de MG-CIM (9,88 µM), seguido de Ag-fendiona (10,10 µM) e, por último, fendiona (42,06 µM). Entre os sais, AgNO₃ exibiu alguma atividade contra as amostras de *K. pneumoniae* (MG-CIM

52,98 μM), enquanto que $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ não afetou o crescimento bacteriano, mesmo na maior concentração testada (400,5 μM).

Figura 10 – Valores de CIM para as 46 amostras de *K. pneumoniae* testadas frente a fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona



Pontos pretos indicando a CIM de cada amostra e linhas vermelhas indicando a média da CIM
Os asteriscos indicam significância estatística

FONTE: O autor (2018)

Tabela 2 – Valores de CIM para *K. pneumoniae* frente a fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona e sais de prata e cobre

Composto	Variação da CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₅₀ em $\mu\text{g/mL}$ (μM)	CIM ₉₀ em $\mu\text{g/mL}$ (μM)	MG-CIM em $\mu\text{g/mL}$ (μM)
Fendiona (n=46)	3,12-25	12,50 (59,47)	25,00 (118,94)	8,84 (42,06)
Cu-fendiona (n=46)	3,12-25	12,50 (12,95)	25,00 (25,91)	9,53 (9,88)
Ag-fendiona (n=46)	3,12-12,5	6,25 (9,96)	12,5 (19,91)	6,34 (10,10)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (n=9)	ND	>100 (>400,5)	>100 (>400,5)	ND
AgNO_3 (n=9)	6,25-12,5	6,25 (36,79)	12,5 (73,59)	9,00 (52,98)

CIM50 – concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das cepas testadas

CIM90 – concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas avaliadas

MG-CIM – média geométrica da CIM.

FONTE: O autor (2018)

6.2.2 Determinação da concentração bactericida mínima

As 46 amostras foram avaliadas em relação aos efeitos bactericidas dos três compostos em estudo. Foi verificada atividade bactericida para os três compostos estudados, com valores de CBM variando de 3,12 a 50 µg/mL para fendiona e Cu-fendiona, e de 3,12 a 25 µg/mL para Ag-fendiona. Na tabela 3 estão representados, para cada composto, os valores de CBM₅₀, CBM₉₀ e MG-CBM, bem como os valores de MG-CIM para efeito de comparação. Ag-fendiona foi o composto que apresentou o menor valor de MG-CBM (13,06 µM), seguido de Cu-fendiona (13,75 µM) e, por último, fendiona (71,27 µM).

Tabela 3 – Valores de CBM e MG-CIM da fendiona e seus derivados no crescimento de amostras de *K. pneumoniae* (n=46)

Composto	CBM ₅₀ em µg/mL (µM)	CBM ₉₀ em µg/mL (µM)	MG-CBM em µg/mL (µM)
Fendiona	12,50 (59,47)	50,00 (237,88)	14,98 (71,27)
Cu-fendiona	12,50 (12,95)	50,00 (51,81)	13,27 (13,75)
Ag-fendiona	6,25 (9,96)	12,50 (19,91)	8,20 (13,06)

CBM₅₀ – concentração bactericida mínima capaz de levar à morte de 50% das cepas testadas

CBM₉₀ – concentração bactericida mínima capaz de levar à morte de 90% das cepas avaliadas

MG-CBM – média geométrica da CBM

FONTE: O autor (2018)

6.3 Efeitos de fendiona e seus derivados combinados a carbapenêmicos sobre amostras de *K. pneumoniae*

6.3.1 Método *Checkerboard*

Por meio do método de *checkerboard* foram avaliadas seis combinações antimicrobianas distintas sobre nove amostras clonalmente não relacionadas (46B, 105B e 116B isoladas de sangue, 5B e 51B de swab retal; 89B e 91B de ponta de cateter; 33B de urina e 47B de aspirado traqueal). As combinações testadas foram: MPM x fendiona, MPM x Cu-fendiona, MPM x Ag-fendiona, IMP x fendiona, IMP x

Cu-fendiona e IMP x Ag-fendiona. Os critérios de avaliação utilizados na seleção das concentrações mais eficazes foram: presença de efeito sinérgico e redução dos valores da CIM dos carbapenêmicos, em combinação com os compostos, para valores menores que os pontos de corte que definem resistência segundo o CLSI (2017). Assim, valores de CIM foram considerados na faixa de resistência quando $\geq 4 \mu\text{g/mL}$, intermediários quando iguais a $2 \mu\text{g/mL}$ e na faixa de sensibilidade quando $< 1 \mu\text{g/mL}$. Atividade sinérgica e/ou aditiva foi observada nas seis combinações testadas, sendo a combinação IMP x Cu-fendiona a única a apresentar apenas efeito aditivo para as nove amostras testadas. As associações MPM x Cu-fendiona e MPM x fendiona exibiram sinergismo em 7 e 6 amostras, respectivamente, enquanto que MPM x Ag-fendiona produziu efeito sinérgico em 3 das 9 amostras testadas. As combinações IMP x fendiona e IMP x Ag-fendiona apresentaram efeito aditivo em 8 e 7 das 9 amostras testadas, respectivamente. Destaca-se a ausência de associação indiferente ou antagônica em todas as amostras para todas as combinações testadas. Estão representados nas tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9 os valores de ICIF da concentração mais eficaz de cada combinação para cada amostra de *K. pneumoniae*.

Tabela 4 – Efeito da associação de meropenem com fendiona por meio do método de *checkerboard* sobre amostras de *K. pneumoniae*

Amostras	Substância	CIM da Substância sozinha (µg/ml)	CIM da Substância combinada (µg/ml)	CIF	ICIF
5B	Meropenem	64	8	0,125	0,375 (Sn)
	Fendiona	6,25	1,5625	0,25	
33B	Meropenem	8	2	0,25	0,5 (Sn)
	Fendiona	3,125	0,78125	0,25	
46B	Meropenem	8	2	0,25	0,5 (Sn)
	Fendiona	12,5	3,125	0,25	
47B	Meropenem	8	2	0,25	0,75 (Ad)
	Fendiona	6,25	3,125	0,5	
51B	Meropenem	8	2	0,25	0,5 (Sn)
	Fendiona	6,25	1,5625	0,25	
89B	Meropenem	32	8	0,25	0,5 (Sn)
	Fendiona	6,25	1,5625	0,25	
91B	Meropenem	8	2	0,25	0,75 (Ad)
	Fendiona	6,25	3,125	0,5	
105B	Meropenem	8	1	0,125	0,625 (Ad)
	Fendiona	12,5	6,25	0,5	
116B	Meropenem	2	0,5	0,25	0,5(Sn)
	Fendiona	6,25	1,5625	0,25	

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada; O ICIF foi obtido a partir da soma do CIF A (CIM do antimicrobiano A em combinação / CIM do antimicrobiano A sozinho) com o CIF B (CIM do antimicrobiano B em combinação / CIM do antimicrobiano B sozinho). Assim, o sinergismo (Sg) foi definido como um $ICIF \leq 0,5$; aditividade (Ad) foi definida como $ICIF > 0,5$ a $< 2,0$; indiferença (Id) foi definida como $ICIF \geq 2,0$ a < 4 e antagonismo (At) foi definido como $ICIF \geq 4,0$.

FONTE: O autor (2018)

Tabela 5 - Efeito da associação de meropenem com Cu-fendiona por meio do método de *checkerboard* sobre amostras de *K. pneumoniae*

Amostras	Substância	CIM da Substância sozinha (µg/ml)	CIM da Substância combinada (µg/ml)	CIF	ICIF
5B	Meropenem	64	16	0,25	0,5 (Sn)
	Cu-fendiona	12,5	3,125	0,25	
33B	Meropenem	8	2	0,25	0,5 (Sn)
	Cu-fendiona	6,25	1,5625	0,25	
46B	Meropenem	8	2	0,25	0,375 (Sn)
	Cu-fendiona	6,25	0,78125	0,125	
47B	Meropenem	8	1	0,125	0,375 (Sn)
	Cu-fendiona	6,25	1,5625	0,25	
51B	Meropenem	8	1	0,125	0,375 (Sn)
	Cu-fendiona	6,25	1,5625	0,25	
89B	Meropenem	32	4	0,125	0,625 (Ad)
	Cu-fendiona	12,5	6,25	0,5	
91B	Meropenem	8	2	0,25	0,5 (Sn)
	Cu-fendiona	6,25	1,5625	0,25	
105B	Meropenem	8	2	0,25	0,5 (Sn)
	Cu-fendiona	6,25	1,5625	0,25	
116B	Meropenem	2	1	0,5	0,625 (Ad)
	Cu-fendiona	6,25	0,78125	0,125	

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada; O ICIF foi obtido a partir da soma do CIF A (CIM do antimicrobiano A em combinação / CIM do antimicrobiano A sozinho) com o CIF B (CIM do antimicrobiano B em combinação / CIM do antimicrobiano B sozinho). Assim, o sinergismo (Sg) foi definido como um $ICIF \leq 0,5$; aditividade (Ad) foi definida como $ICIF > 0,5$ a $< 2,0$; indiferença (Id) foi definida como $ICIF \geq 2,0$ a < 4 e antagonismo (At) foi definido como $ICIF \geq 4,0$.

FONTE: O autor (2018)

Tabela 6 - Efeito da associação de meropenem com Ag-fendiona por meio do método de *checkerboard* sobre amostras de *K. pneumoniae*

Amostras	Substância	CIM da Substância sozinha (µg/ml)	CIM da Substância combinada (µg/ml)	CIF	ICIF
5B	Meropenem	64	16	0,25	0,375 (Sn)
	Ag-fendiona	6,25	0,78125	0,125	
33B	Meropenem	8	2	0,25	0,5 (Sn)
	Ag-fendiona	6,25	1,5625	0,25	
46B	Meropenem	8	1	0,125	0,625 (Ad)
	Ag-fendiona	6,25	3,125	0,5	
47B	Meropenem	8	2	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	3,125	1,5625	0,5	
51B	Meropenem	8	0,5	0,0625	0,5625 (Ad)
	Ag-fendiona	3,125	1,5625	0,5	
89B	Meropenem	32	2	0,0625	0,5625 (Ad)
	Ag-fendiona	3,125	1,5625	0,5	
91B	Meropenem	8	2	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	3,125	1,5625	0,5	
105B	Meropenem	8	2	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	3,125	1,5625	0,5	
116B	Meropenem	2	0,25	0,125	0,375 (Sn)
	Ag-fendiona	3,125	0,78125	0,25	

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada; O ICIF foi obtido a partir da soma do CIF A (CIM do antimicrobiano A em combinação / CIM do antimicrobiano A sozinho) com o CIF B (CIM do antimicrobiano B em combinação / CIM do antimicrobiano B sozinho). Assim, o sinergismo (Sg) foi definido como um $ICIF \leq 0,5$; aditividade (Ad) foi definida como $ICIF > 0,5$ a $< 2,0$; indiferença (Id) foi definida como $ICIF \geq 2,0$ a < 4 e antagonismo (At) foi definido como $ICIF \geq 4,0$.

FONTE: O autor (2018)

Tabela 7 - Efeito da associação de imipenem com fendiona por meio do método de *checkerboard* sobre amostras de *K. pneumoniae*

Amostras	Substância	CIM da Substância sozinha (µg/ml)	CIM da Substância combinada (µg/ml)	CIF	ICIF
5B	Imipenem	64	32	0,5	1 (Ad)
	Fendiona	6,25	3,125	0,5	
33B	Imipenem	4	2	0,5	1 (Ad)
	Fendiona	6,25	3,125	0,5	
46B	Imipenem	8	2	0,25	0,5 (Sn)
	Fendiona	12,5	3,125	0,25	
47B	Imipenem	8	4	0,5	0,625 (Ad)
	Fendiona	6,25	0,78125	0,125	
51B	Imipenem	4	2	0,5	0,625 (Ad)
	Fendiona	12,5	1,5625	0,125	
89B	Imipenem	32	2	0,0625	0,5625 (Ad)
	Fendiona	12,5	6,25	0,5	
91B	Imipenem	8	4	0,5	0,625 (Ad)
	Fendiona	6,25	0,78125	0,125	
105B	Imipenem	8	4	0,5	1 (Ad)
	Fendiona	6,25	3,125	0,5	
116B	Imipenem	4	0,125	0,03125	0,5313 (Ad)
	Fendiona	6,25	3,12	0,5	

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada; O ICIF foi obtido a partir da soma do CIF A (CIM do antimicrobiano A em combinação / CIM do antimicrobiano A sozinho) com o CIF B (CIM do antimicrobiano B em combinação / CIM do antimicrobiano B sozinho). Assim, o sinergismo (Sg) foi definido como um $ICIF \leq 0,5$; aditividade (Ad) foi definida como $ICIF > 0,5$ a $< 2,0$; indiferença (Id) foi definida como $ICIF \geq 2,0$ a < 4 e antagonismo (At) foi definido como $ICIF \geq 4,0$.

FONTE: O autor (2018)

Tabela 8 - Efeito da associação de imipenem com Cu-fendiona por meio do método de *checkerboard* sobre amostras de *K. pneumoniae*

Amostras	Substância	CIM da Substância sozinha (µg/ml)	CIM da Substância combinada (µg/ml)	CIF	ICIF
5B	Imipenem	64	16	0,25	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	12,5	6,25	0,5	
33B	Imipenem	4	2	0,5	0,625 (Ad)
	Cu-fendiona	6,25	0,78125	0,125	
46B	Imipenem	8	4	0,5	0,625 (Ad)
	Cu-fendiona	6,25	0,78125	0,125	
47B	Imipenem	4	1	0,25	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	6,25	3,125	0,5	
51B	Imipenem	4	2	0,5	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	6,25	1,5625	0,25	
89B	Imipenem	32	2	0,0625	0,5625 (Ad)
	Cu-fendiona	12,5	6,25	0,5	
91B	Imipenem	4	2	0,5	1 (Ad)
	Cu-fendiona	6,25	3,125	0,5	
105B	Imipenem	8	4	0,5	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	6,25	1,5625	0,25	
116B	Imipenem	4	1	0,25	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	6,25	3,125	0,5	

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada; O ICIF foi obtido a partir da soma do CIF A (CIM do antimicrobiano A em combinação / CIM do antimicrobiano A sozinho) com o CIF B (CIM do antimicrobiano B em combinação / CIM do antimicrobiano B sozinho). Assim, o sinergismo (Sg) foi definido como um $ICIF \leq 0,5$; aditividade (Ad) foi definida como $ICIF > 0,5$ a $< 2,0$; indiferença (Id) foi definida como $ICIF \geq 2,0$ a < 4 e antagonismo (At) foi definido como $ICIF \geq 4,0$.

FONTE: O autor (2018)

Tabela 9 - Efeito da associação de imipenem com Ag-fendiona por meio do método de *checkerboard* sobre amostras de *K. pneumoniae*

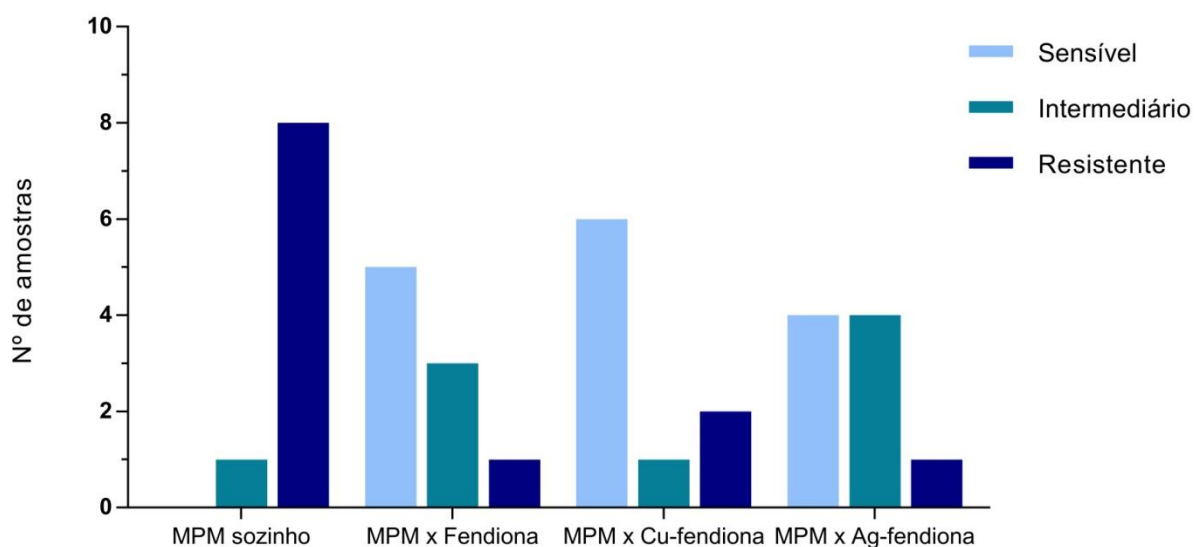
Amostras	Substância	CIM da Substância sozinha (µg/ml)	CIM da Substância combinada (µg/ml)	CIF	ICIF
5B	Imipenem	128	16	0,125	0,625 (Ad)
	Ag-fendiona	6,25	3,125	0,5	
33B	Imipenem	4	1	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	3,125	1,5625	0,5	
46B	Imipenem	8	2	0,25	0,5 (Sn)
	Ag-fendiona	6,25	1,5625	0,25	
47B	Imipenem	4	2	0,5	1 (Ad)
	Ag-fendiona	1,5625	0,78125	0,5	
51B	Imipenem	8	2	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	6,25	3,125	0,5	
89B	Imipenem	32	8	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	6,25	3,125	0,5	
91B	Imipenem	8	1	0,125	0,625 (Ad)
	Ag-fendiona	3,125	1,5625	0,5	
105B	Imipenem	8	1	0,125	0,625 (Ad)
	Ag-fendiona	3,125	1,5625	0,5	
116B	Imipenem	4	0,5	0,125	0,375 (Sn)
	Ag-fendiona	6,25	1,56	0,5	

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada; O ICIF foi obtido a partir da soma do CIF A (CIM do antimicrobiano A em combinação / CIM do antimicrobiano A sozinho) com o CIF B (CIM do antimicrobiano B em combinação / CIM do antimicrobiano B sozinho). Assim, o sinergismo (Sg) foi definido como um $ICIF \leq 0,5$; aditividade (Ad) foi definida como $ICIF > 0,5$ a $< 2,0$; indiferença (Id) foi definida como $ICIF \geq 2,0$ a < 4 e antagonismo (At) foi definido como $ICIF \geq 4,0$.

FONTE: O autor (2018)

valores determinados pelo CLSI (2017). O número de amostras em cada classificação de suscetibilidade (sensibilidade, resistência intermediária e resistência) ao MPM, em ação desse sozinho e combinado a cada um dos compostos está demonstrado na Figura 12, e para o IMP, em ação desse sozinho e combinado, na Figura 13. Foi observado que, para a combinação de MPM x fendiona, quatro amostras alteraram o perfil fenotípico de suscetibilidade ao MPM de resistente para sensível, três de resistente para resistência intermediária, uma de intermediária pra sensível e a amostra restante, com elevada CIM de resistência (64 µg/mL), reduziu quatro vezes o valor da sua CIM (4 µg/mL), apesar de se manter na faixa de resistência. Para a combinação MPM x Cu-fendiona, cinco amostras alteraram seus valores de CIM para o MPM da faixa de resistência para sensibilidade e uma de resistência intermediária para sensibilidade. Para a combinação MPM x Ag-fendiona, três amostras alteraram o perfil fenotípico de suscetibilidade ao MPM de resistente para sensível e uma de resistência intermediária pra sensível. Foi verificado que, para a combinação de IMP x fendiona, três amostras alteraram o perfil fenotípico de suscetibilidade ao IMP de resistente para sensível e duas de resistente para resistência intermediária. Para a combinação IMP x Cu-fendiona, duas amostras alteraram seus valores de CIM para o IMP da faixa de resistência para sensibilidade e cinco de resistência intermediária para sensibilidade. Para a combinação IMP x Ag-fendiona, quatro amostras alteraram o perfil fenotípico de suscetibilidade ao MPM de resistente para sensível e três de resistência intermediária para sensível. Na obtenção desses resultados foram consideradas, para cada amostra, as concentrações das combinações que originaram a menor CIM para o carbapenêmico, não sendo necessariamente aquelas que originaram o menor valor de ICIF.

Figura 12 – Classificação da suscetibilidade das amostras ao meropenem em ação desse sozinho e combinado a fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona

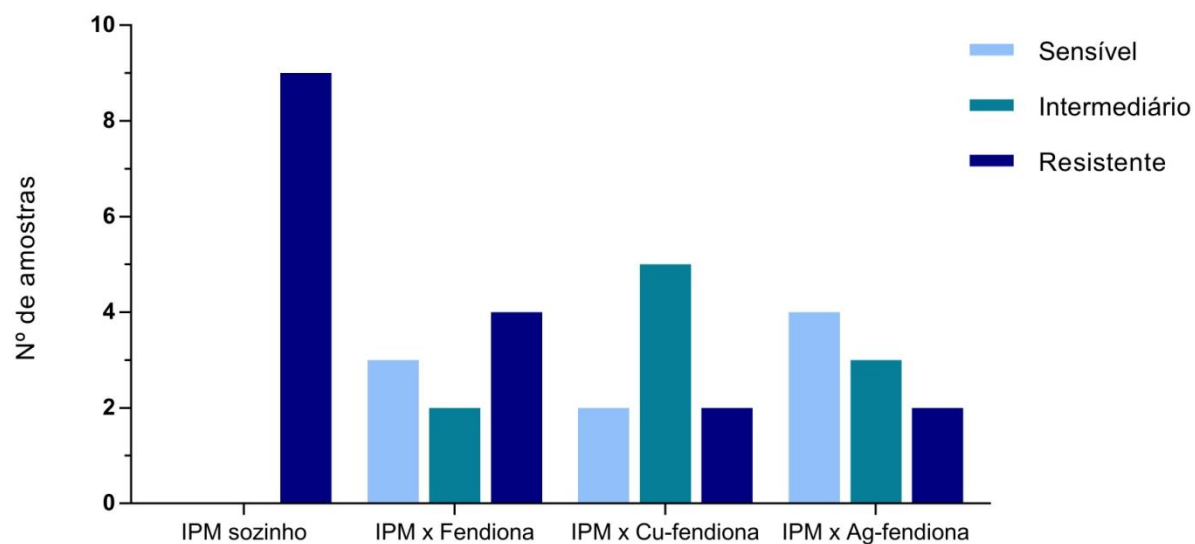


Classificação segundo o CLSI (2017)

Sensível quando $< 1 \mu\text{g/mL}$, intermediário quando $2 \mu\text{g/mL}$ e resistente quando $\geq 4 \mu\text{g/mL}$

FONTE: O autor (2018)

Figura 13 – Classificação da suscetibilidade das amostras ao imipenem em ação desse sozinho e combinado a fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona



Classificação segundo o CLSI (2017)

Sensível quando $< 1 \mu\text{g/mL}$, intermediário quando $2 \mu\text{g/mL}$ e resistente quando $\geq 4 \mu\text{g/mL}$

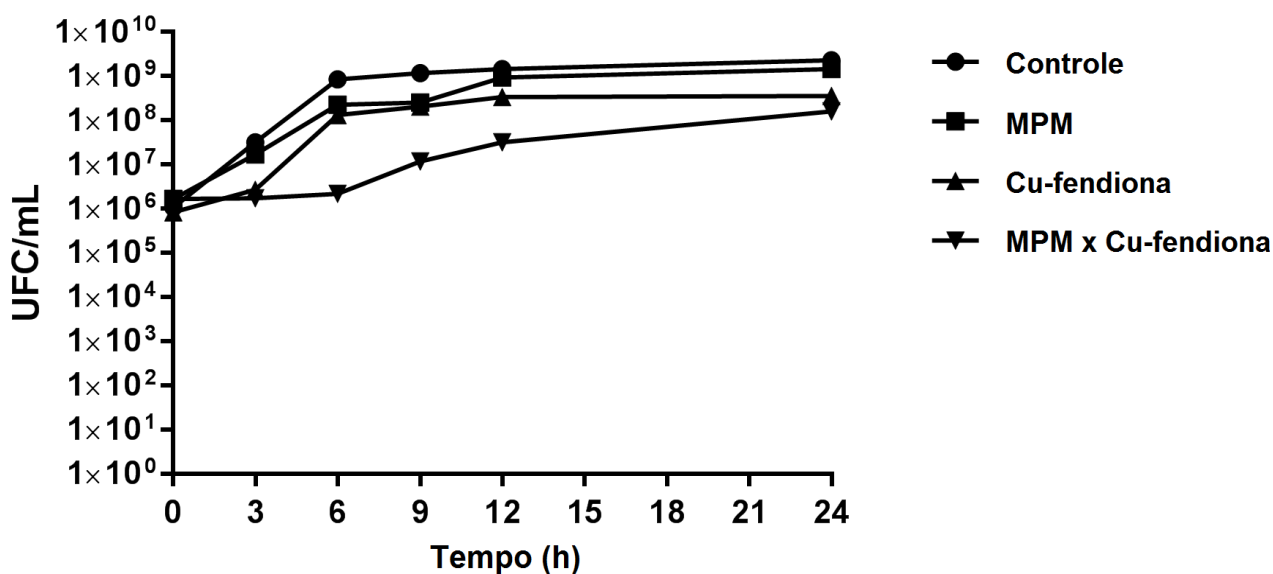
FONTE: O autor (2018)

6.3.2 – Curva de tempo-morte

Por meio desse método, foram investigados os efeitos das combinações MPM x Cu-fendiona e MPM x Ag-fendiona sobre a taxa de crescimento de duas amostras clínicas: 5B e 51B. A seleção dessas combinações foi baseada no desempenho superior de Cu-fendiona e Ag-fendiona nos testes de determinação de CIM e CBM, especialmente quando avaliadas em μM , e na maior eficiência das combinações contando o MPM no *checkerboard*. A seleção das amostras foi realizada de modo a contemplar cepas com valores de CIM para o MPM distantes entre si (64 $\mu\text{g/mL}$ para a amostra 5B e 8 $\mu\text{g/mL}$ para a amostra 51B).

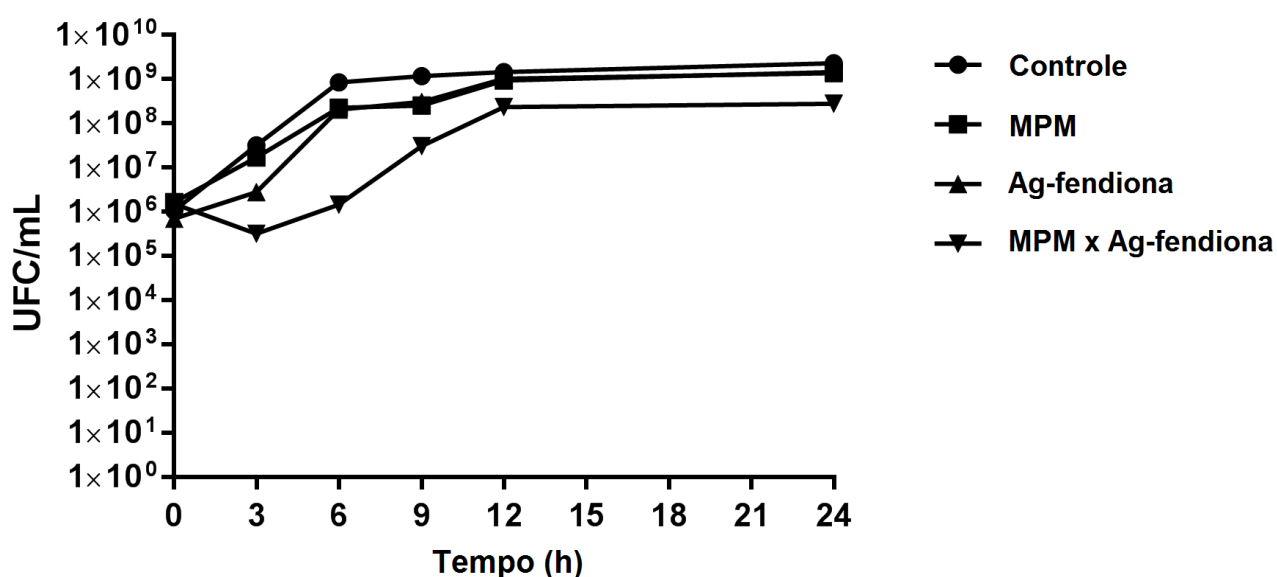
Uma vez selecionadas, as combinações foram testadas pelo método de curva tempo-morte nas concentrações que originaram os menores valores de ICIF no *checkerboard*. Assim, nas Figuras 14 e 15 foram representadas as curvas de morte e crescimento obtidas das combinações MPM a 16 $\mu\text{g/mL}$ ($1/4$ xCIM) x Cu-fendiona a 3,12 $\mu\text{g/mL}$ ($1/4$ xCIM) e MPM a 16 $\mu\text{g/mL}$ ($1/4$ xCIM) x Ag-fendiona a 0,78 $\mu\text{g/mL}$ ($1/8$ xCIM) sobre a amostra 5B.

Figura 14 – Curva tempo-morte da amostra clínica 5B tratada com a combinação de MPM a 16 $\mu\text{g/mL}$ ($1/4$ xCIM) x Cu-fendiona a 3,12 $\mu\text{g/mL}$ ($1/4$ xCIM)



FONTE: O autor (2018)

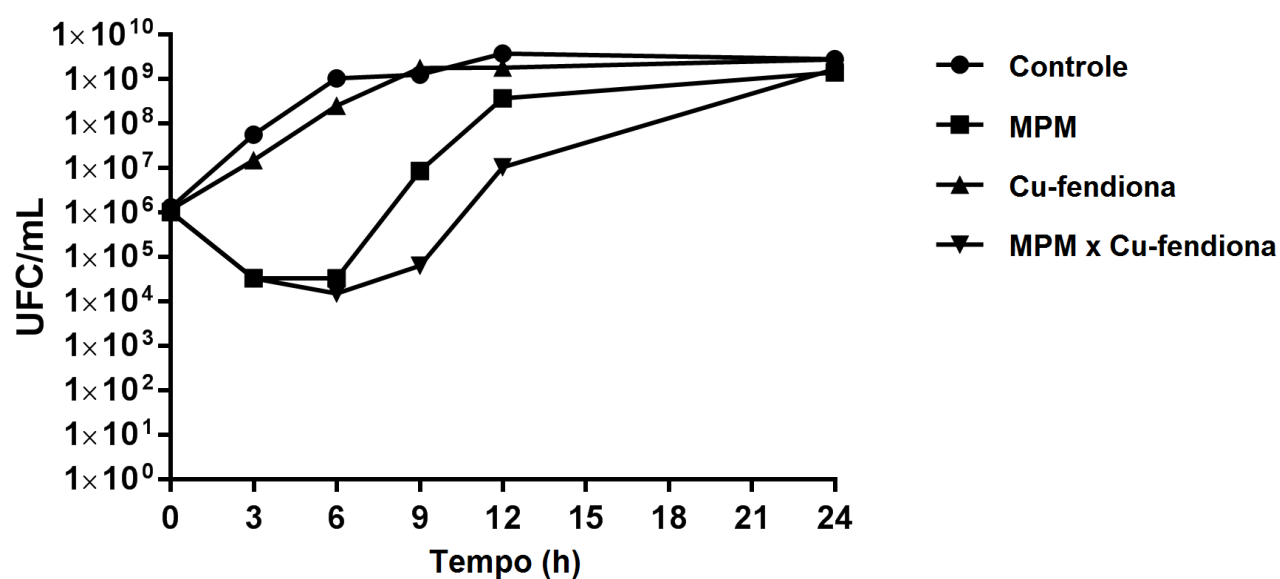
Figura 15 – Curva tempo-morte da amostra clínica 5B tratada com a combinação de MPM a 16 µg/mL ($1/4$ xCIM) x Ag-fendiona a 0,78 µg/mL ($1/8$ xCIM)



FONTE: O autor (2018)

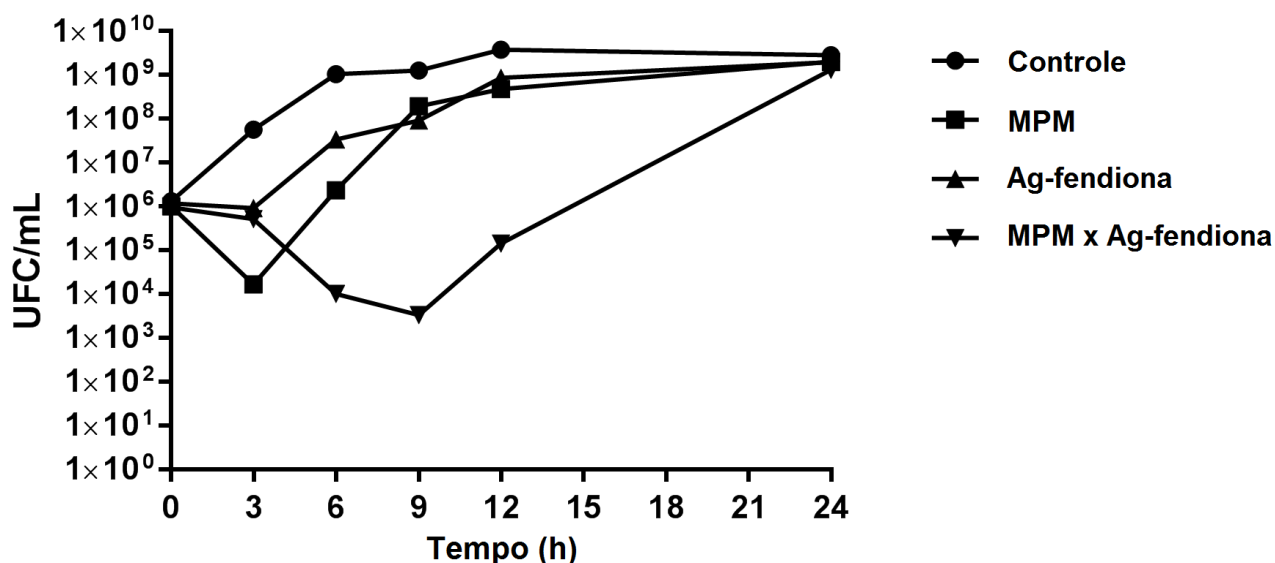
Nas Figuras 16 e 17 estão representadas as curvas obtidas das combinações MPM a 1,0 µg/mL ($1/8$ xCIM) x Cu-fendiona a 1,56 µg/mL ($1/8$ xCIM) e MPM a 0,5 µg/mL ($1/16$ xCIM) x Ag-fendiona a 1,56 µg/mL ($1/4$ xCIM) sobre a amostra 51B.

Figura 16 – Curva tempo-morte da amostra clínica 51B tratada com a combinação de MPM a 1,0 µg/mL ($1/8$ xCIM) x Cu-fendiona a 1,56 µg/mL ($1/8$ xCIM)



FONTE: O autor (2018)

Figura 17 – Curva tempo-morte da amostra clínica 51B tratada com a combinação de MPM a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($1/16$ xCIM) x Ag-fendiona a 1,56 $\mu\text{g/mL}$ ($1/4$ xCIM)

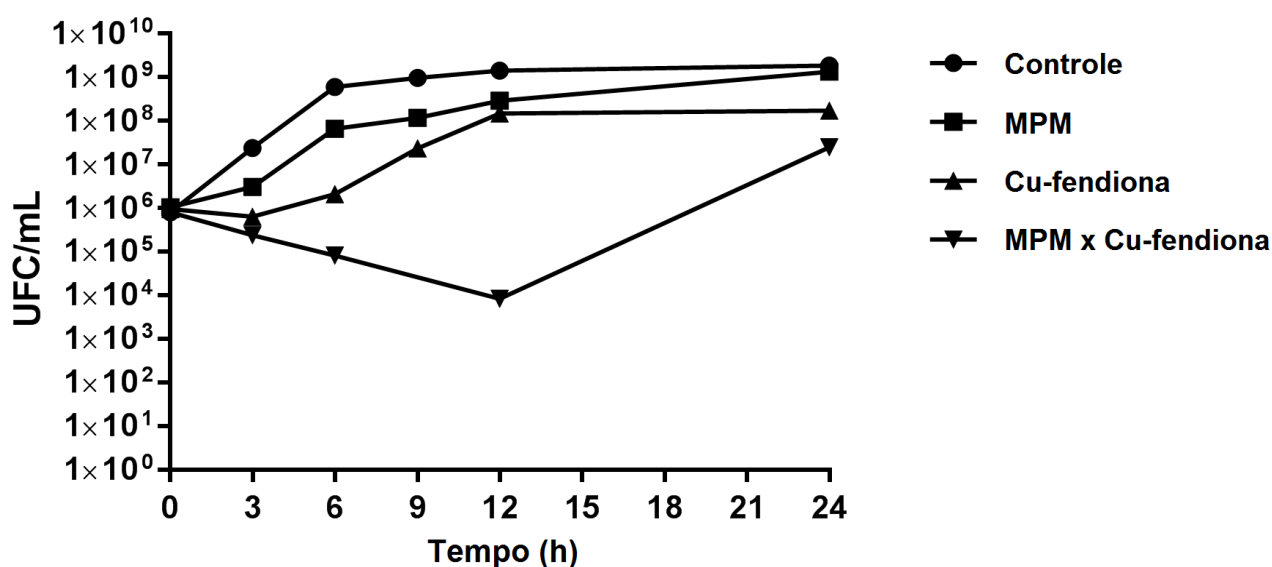


FONTE: O autor (2018)

Os resultados demonstraram que, sobre a amostra 5B, a combinação MPM x Cu-fendiona impediu o crescimento até o tempo de 6 h, entretanto não foi demonstrada redução significativa na quantidade de UFC. Sobre essa mesma amostra, a combinação MPM x Ag-fendiona resultou em morte nas três primeiras horas, sendo retomado o crescimento já nas três horas seguintes, com superação da quantidade de UFC inicial apenas após 6 h de atividade. Foi observada diferença superior a dois $\log_{10}$ na contagem de UFC/mL apenas para a combinação MPM x Ag-fendiona, evidenciando seu efeito sinérgico sobre a amostra 5B. Sobre a amostra 51B, foi observada uma mortalidade mais expressiva sob efeito de ambas as combinações, entretanto, mortalidade semelhante foi também alcançada pelos efeitos do MPM sozinho nas três primeiras horas. A partir de então, observou-se uma diferenciação nas curvas, com melhor desempenho das combinações em inibir o crescimento das amostras. A combinação MPM x Ag-fendiona se mostrou mais efetiva, superando consideravelmente a mortalidade do MPM a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e exibindo sinergismo no tempo de 9 h. A combinação MPM x Cu-fendiona, também no tempo de 9 h, apresentou efeito sinérgico, porém com menor redução na contagem de UFC/mL em relação aos agentes sozinhos.

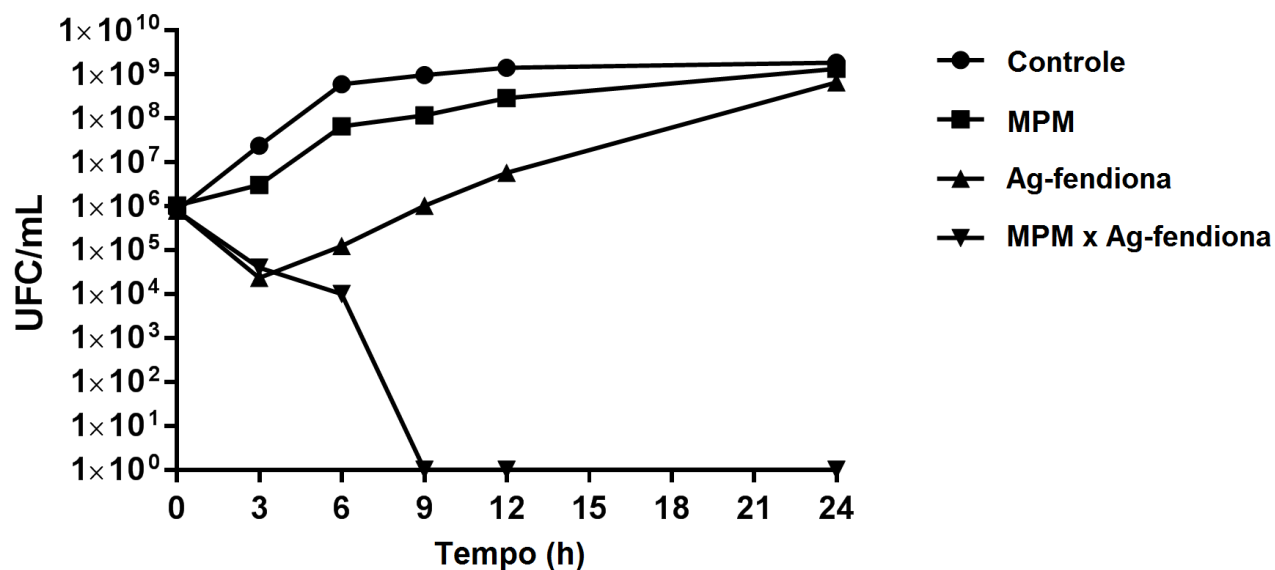
Posteriormente, as combinações foram avaliadas sob novas concentrações, que consistiram em $\frac{1}{2}$ xCIM de cada agente. Dessa forma, nas Figuras 18 e 19 estão representadas as curvas de morte e crescimento obtidas das combinações MPM a 32 $\mu\text{g/mL}$ x Cu-fendiona a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e MPM a 32 $\mu\text{g/mL}$ x Ag-fendiona a 3,12 $\mu\text{g/mL}$ sobre a amostra 5B.

Figura 18 – Curva tempo-morte da amostra clínica 5B tratada com a combinação de MPM a 32 $\mu\text{g/mL}$ ($\frac{1}{2}$ xCIM) x Cu-fendiona a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ ($\frac{1}{2}$ xCIM)



FONTE: O autor (2018)

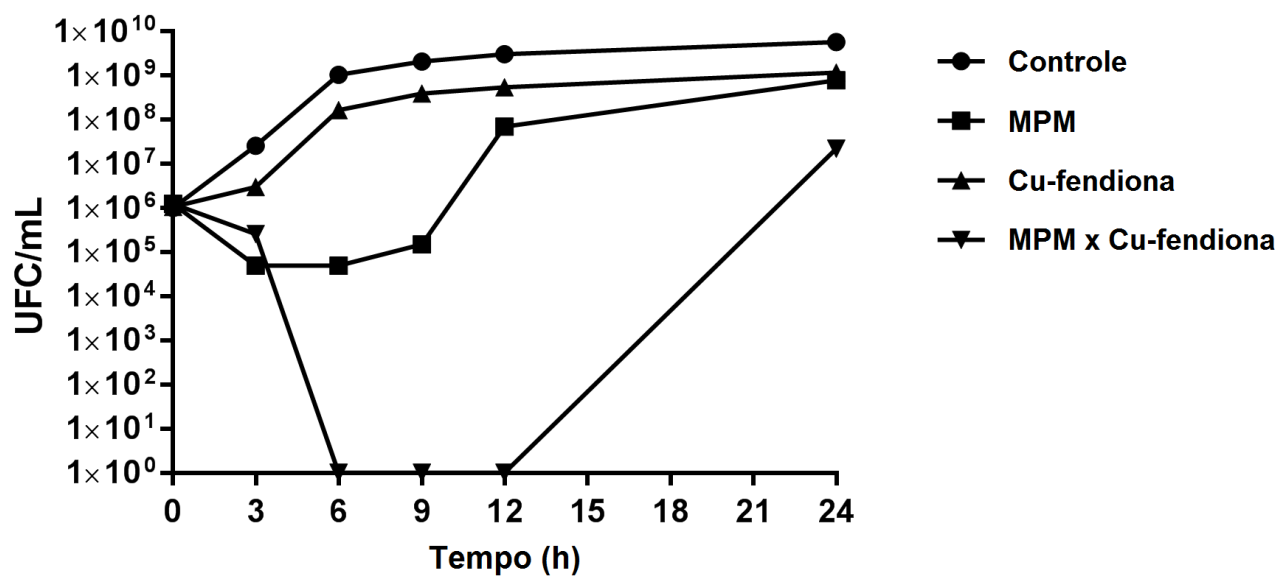
Figura 19 – Curva tempo-morte da amostra clínica 5B tratada com a combinação de MPM a 32 $\mu\text{g/mL}$ ($\frac{1}{2}$ xCIM) x Ag-fendiona a 3,12 $\mu\text{g/mL}$ ($\frac{1}{2}$ xCIM)



FONTE: O autor (2018)

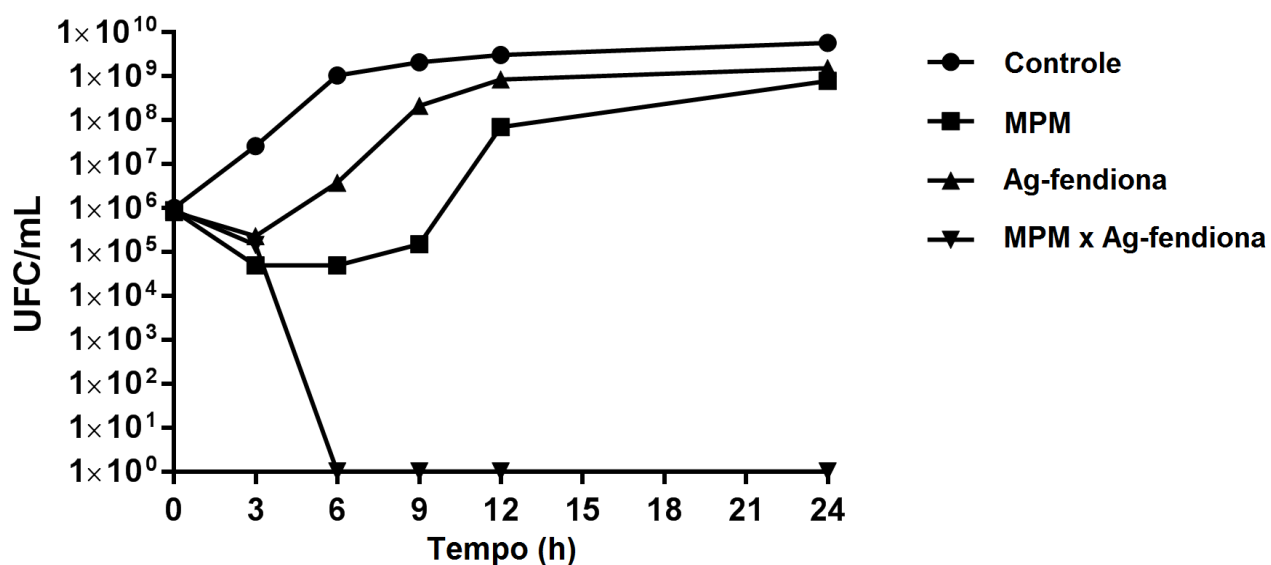
Nas Figuras 20 e 21 estão representadas as curvas obtidas das combinações MPM a 4 µg/mL x Cu-fendiona a 3,12 µg/mL e MPM a 4 µg/mL x Ag-fendiona a 1,56 µg/mL sobre a amostra 51B.

Figura 20 – Curva tempo-morte da amostra clínica 51B tratada com a combinação de MPM a 0,5 µg/mL ($1/2$ xCIM) x Cu-fendiona a 3,12 µg/mL ($1/2$ xCIM)



FONTE: O autor (2018)

Figura 21 - Curva tempo-morte da amostra clínica 51B tratada com a combinação de MPM a 0,5 µg/mL ($1/2$ xCIM) x Ag-fendiona a 1,56 µg/mL ($1/2$ xCIM)



FONTE: O autor (2018)

Os dados mostram que as combinações formadas por $\frac{1}{2}$ xCIM de cada substância, sobre as duas amostras, foi capaz de reduzir a quantidade de UFC a valores indetectáveis, que segundo a sensibilidade do teste, situam-se abaixo de 10^3 UFC/mL. Esse valor de sensibilidade é dado pela limitação do método de curva tempo-morte em escala de microdiluição, que permite semeadura das diluições das culturas apenas a partir daquela correspondente ao inóculo $\times 10^{-2}$, não permitindo assim a obtenção de valores inferiores a 10^3 UFC/mL. A combinação MPM x Cu-fendiona exibiu retomada de crescimento após 12 h para ambas as amostras, ao passo que a combinação MPM x Ag-fendiona manteve os valores de UFC abaixo da sensibilidade até 24 h nas duas amostras. Essa última combinação provou ser capaz de erradicar ambas as amostras após teste com semeadura diretamente da microplaca ao final das 24 h de experimentação. Todas as combinações testadas demonstraram efeito sinérgico com 12 h de ação, evidenciado pela redução de pelo menos 2 log na contagem de UFC/mL comparada com os agentes sozinhos.

6.4 - Efeitos fendiona e seus derivados sozinhos ou em combinação a carbapenêmicos em modelo invertebrado de *G. mellonella*

6.4.1 Teste de toxicidade de fendiona e seus derivados e do meropenem

A avaliação da toxicidade *in vivo* foi realizada em modelo invertebrado de *G. mellonella* com os três compostos estudados. As taxas de sobrevivência obtidas pela administração de fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona não exibiram diferenças significativas em relação às taxas obtidas pela administração de PBS. Esses resultados apontam que os compostos não exerceram efeitos tóxicos consideráveis nas larvas, durante um período de 96 h, em qualquer uma das concentrações testadas.

A toxicidade *in vivo* do MPM foi investigada em larvas de *G. mellonella* como processo de padronização para experimentos seguintes, os quais determinam a atividade desse antimicrobiano sozinho e combinado aos compostos em estudo sobre a infecção por *K. pneumoniae*. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as taxas de sobrevivência obtidas pela administração de MPM, em qualquer uma das concentrações, e PBS. Os resultados, portanto, demonstram ausência de efeitos tóxicos consideráveis nas larvas durante um período de 96 h.

6.4.2 - Infecção e índice de sobrevivência

Nesse experimento, seis amostras de *K. pneumoniae* não clonalmente relacionadas foram testadas quanto ao potencial infeccioso em larvas de *G. mellonella*, com o intuito de determinar a concentração de inóculo a ser empregada nos testes posteriores, que envolvem a injeção de tratamento após 30 min da infecção da larva. Os resultados foram expressos por meio das taxas de sobrevivência, estimadas com base na ausência de motilidade provocada pelo toque e pela aparência da pigmentação das larvas (Figura 22). Nas Figuras 23, 24 e 25 estão apresentadas as curvas de sobrevivência encontradas para as concentrações de 10^4 , 10^5 , 10^6 UFC, respectivamente. Todas as amostras bacterianas, em todas as concentrações, associaram-se a 100% de sobrevivência larvar em 4 h pós- infecção. As amostras 46B, 47B e 89B não causaram mortalidade significativa nas concentrações de 10^4 e 10^5 UFC em 48 h pós-infecção. Inóculos em concentração de 10^6 UFC foram capazes de levar à morte mais de 90% da população, em todas as amostras testadas, com exceção da amostra 89B.

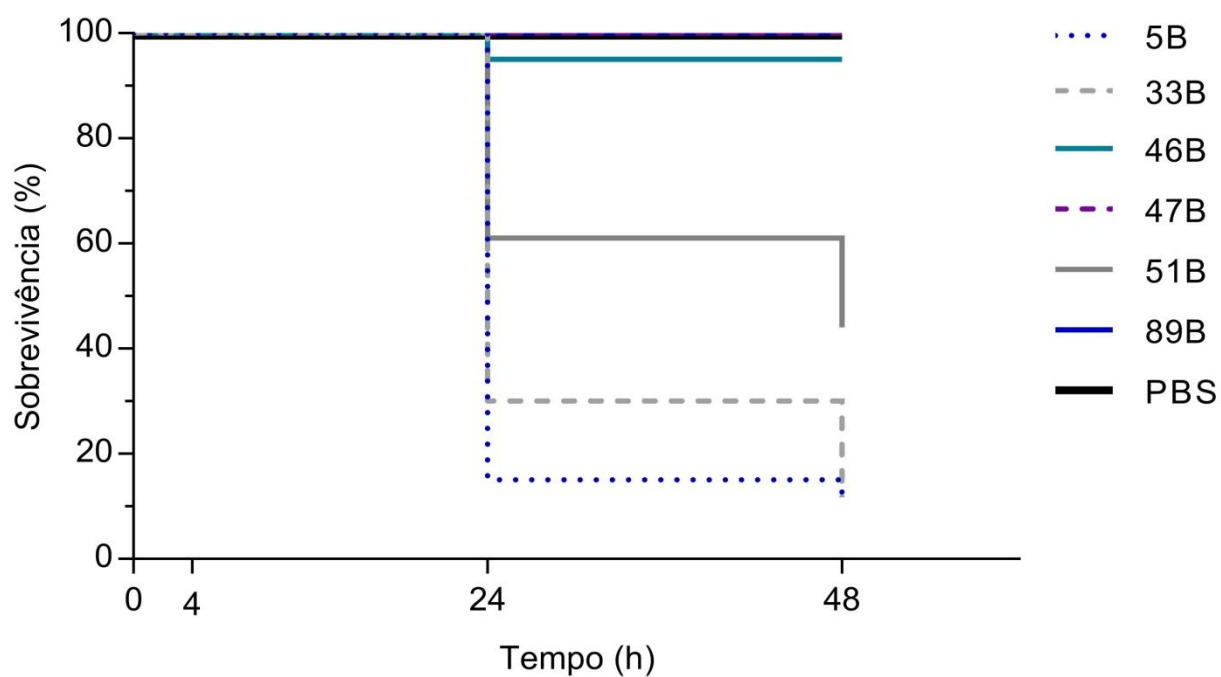
Figura 22 - Alterações de pigmentação em larvas de *G. mellonella*



1: não melanizada; **2 e 3:** pontos de melanização; **4:** melanização do vaso dorsal + melanização parcial da larva; **5:** melanização completa.

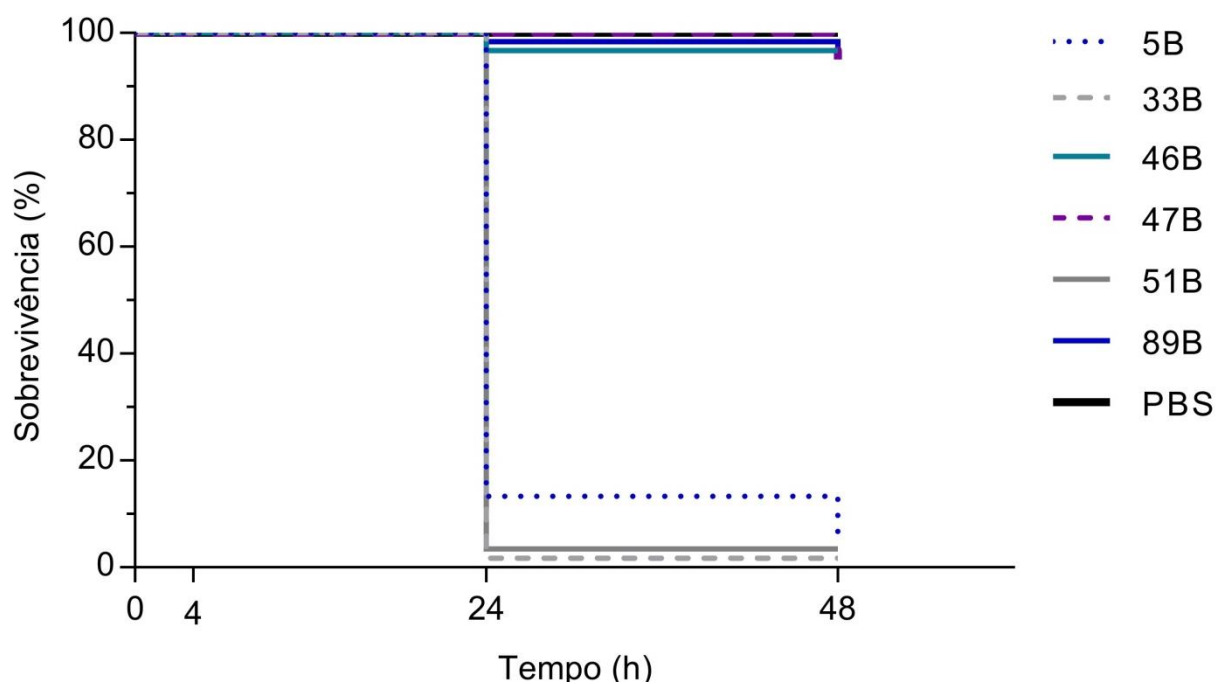
FONTE: O autor (2018)

Figura 23 – Taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com inóculo de *K. pneumoniae* em concentração de 10^4 UFC



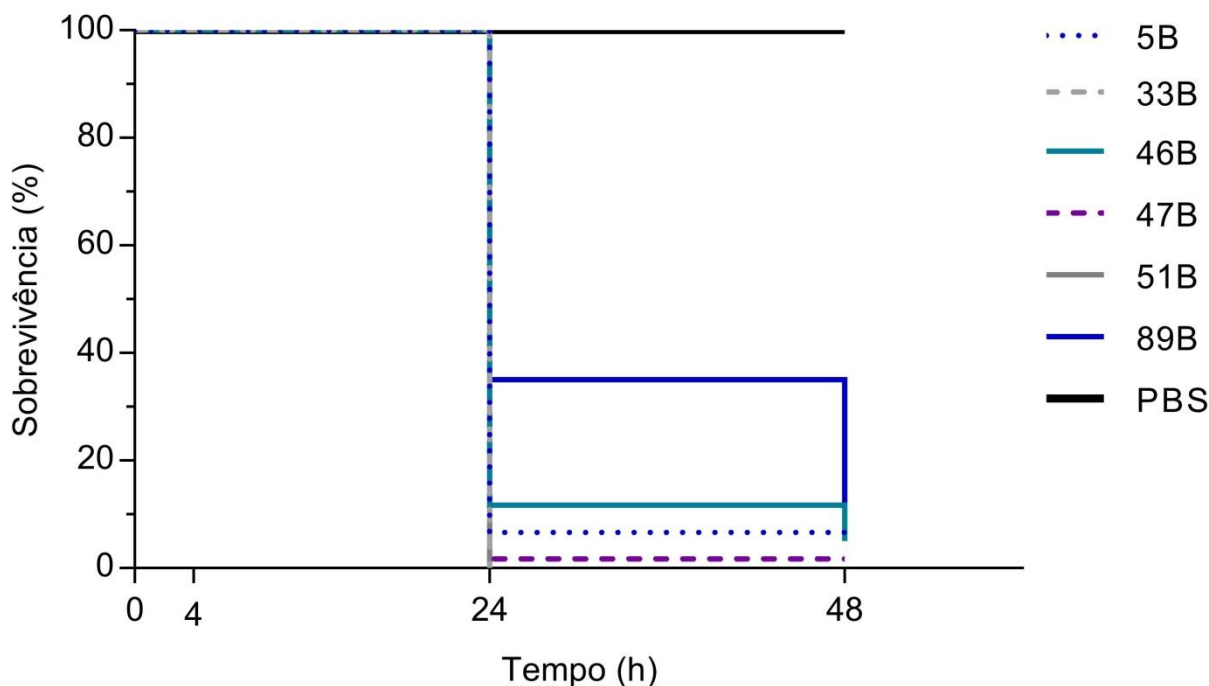
FONTE: O autor (2018)

Figura 24 – Taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com inóculo de *K. pneumoniae* em concentração de 10^5 UFC



FONTE: O autor (2018)

Figura 25 – Taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com inóculo de *K. pneumoniae* em concentração de 10^6 UFC



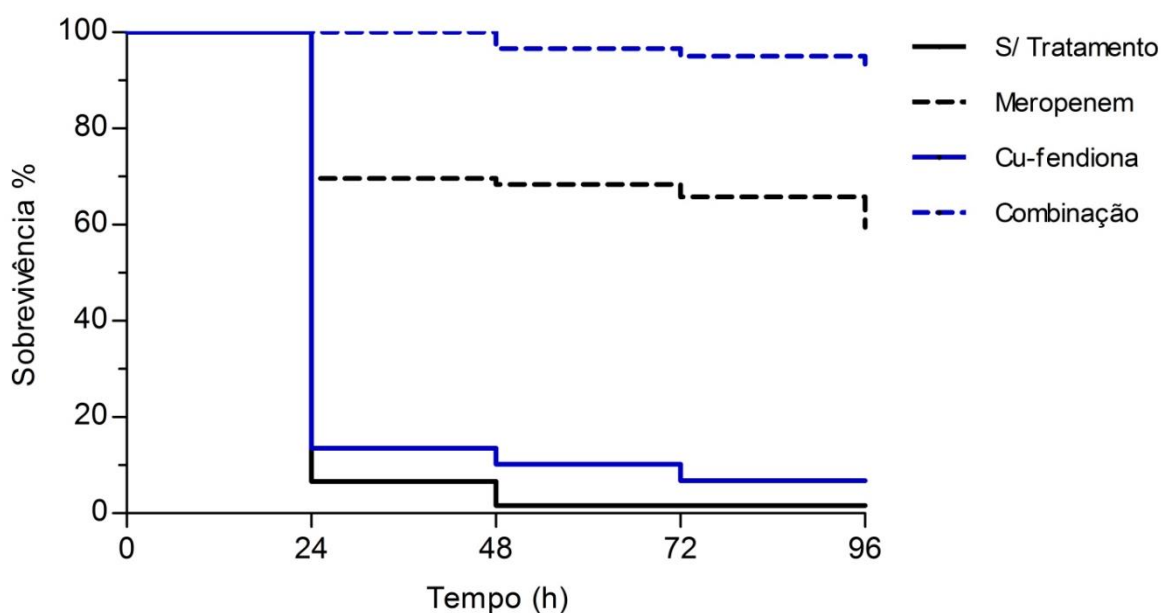
FONTE: O autor (2018)

6.4.3 Avaliação dos efeitos das combinações antimicrobianas em modelo de infecção de *G. mellonella*

Os efeitos da combinação MPM x Cu-fendiona foram investigados utilizando-se o modelo de infecção invertebrado *G. mellonella*. Para isso, as larvas foram inoculadas com suspensões bacterianas na concentração de 10^5 UFC/mL das amostras 5B e 51B e, após 30 min, receberam tratamento antimicrobiano ou PBS estéril (controle não tratado). As curvas de sobrevivência obtidas da administração de MPM x Cu-fendiona, e desses sozinhos, sobre a amostra 5B estão representadas na Figura 26, e sobre a amostra 51B na Figura 27. Observou-se que o grupo sem tratamento exibiu taxa de sobrevivência larvar inferior a 2% para ambas as amostras, e que o composto Cu-fendiona sozinho, na concentração de $\frac{1}{2}$ xCIM não foi efetivo contra essas amostras, exibindo mortalidade equivalente ao grupo não tratado. O MPM sozinho demonstrou atividade superior, gerando taxas de sobrevivência larvar de aproximadamente 78% para a amostra 5B e aproximadamente 64% para a amostra 51B. Entretanto, a combinação MPM x Cu-fendiona apresentou a mais elevada taxa de sobrevivência, consistindo em aproximadamente 93% para a amostra 5B e 97% para a amostra 51B. A análise

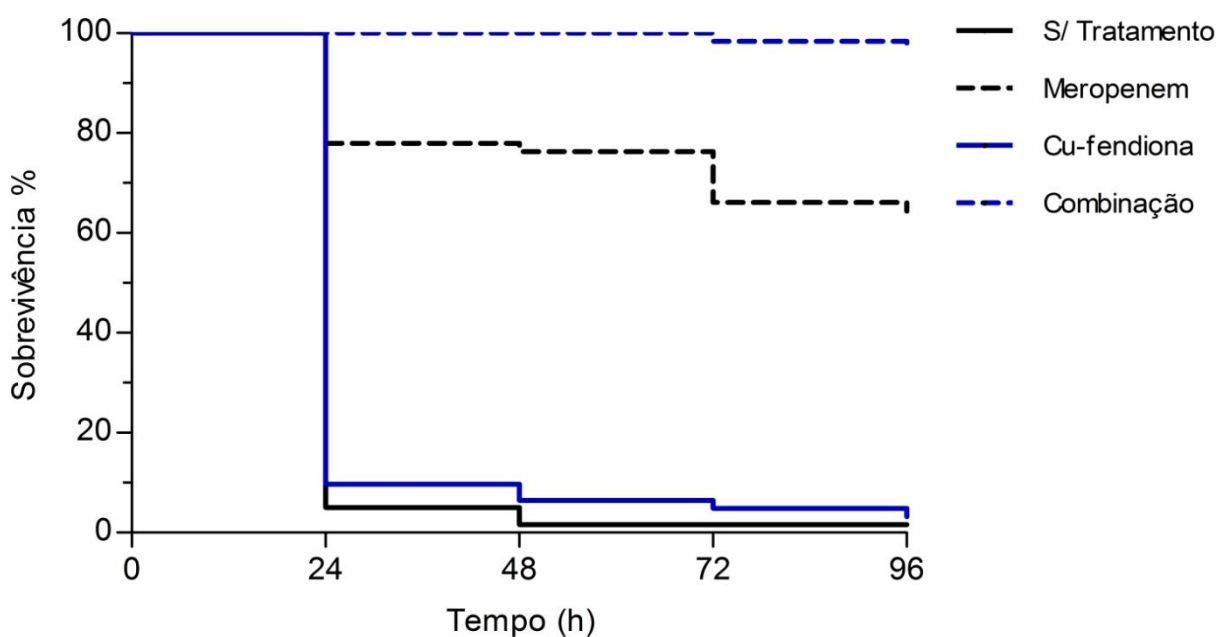
estatística dos resultados pelo método de Kaplan-Meier indica que as curvas de sobrevivência de todos os tratamentos são significativamente diferentes entre si, e que, excetuando-se Cu-fendiona, os demais tratamentos diferenciam-se significativamente do grupo não tratado.

Figura 26 - Taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com a amostra 5B e posteriormente tratadas com MPM e Cu-fendiona sozinhas e combinados entre si



FONTE: O autor (2018)

Figura 27 - Taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com a amostra 51B e posteriormente tratadas com MPM e Cu-fendiona sozinhas e combinados entre si



FONTE: O autor (2018)

7 DISCUSSÃO

A produção da enzima KPC constitui o mais importante mecanismo associado à resistência aos carbapenêmicos (VERA-LEIVA et al., 2017). A problemática das infecções por bactérias produtoras dessa enzima baseia-se na escassez de opções terapêuticas disponíveis e nas altas taxas de mortalidade e de desfechos desfavoráveis aos pacientes (GONÇALVES et al., 2017; SALOMÃO et al., 2017). Estabelecendo o contexto como problemático, a OMS (2017) divulgou uma lista de patógenos para os quais novos tratamentos são urgentemente necessários. A lista foi elaborada com o objetivo de orientar e promover pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos e situou as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos como um dos grupos mais críticos. Nosso estudo avaliou amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase KPC, em adição a outras beta-lactamases, caracterizando um perfil fenotípico de MDR.

Diversas substâncias têm sido estudadas na expectativa de gerar novos fármacos capazes de exercer efeito antimicrobiano por meio de vias distintas daquelas desencadeadas pelas classes antimicrobianas já existentes. Nesse contexto, a fenantrolina e seus derivados constituem compostos promissores, capazes de alterar diversas funções biológicas e, conseqüentemente, a sobrevivência de linhagens de células microbianas, como resultado de sua ação quelante (SANTOS et al., 2012). Uma das moléculas derivadas, a fendiona, sozinha e coordenada a íons Cu^{2+} e Ag^+ , têm demonstrado atividades antifúngica e antibacteriana superiores à precursora fenantrolina (GANDRA et al., 2017; MCCANN et al., 2012b; VIGANOR et al., 2015). Ainda não totalmente elucidados, os potenciais modos de ação desses compostos envolvem alterações na membrana, interferência com processos como a divisão celular e reações dependentes de metais essenciais, em decorrência de atividade quelante (MCCANN et al., 2012b). Assim, fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona podem representar uma nova classe de agentes antimicrobianos, o que, aliado a um perfil de baixa toxicidade, verificado em modelos de infecção invertebrado e roedor, consolida seu potencial terapêutico (MCCANN et al., 2012a).

Em nossa primeira avaliação, verificamos a atividade antimicrobiana dos três compostos (fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona) sobre as 46 amostras de Kp-KPC

na faixa de concentração de 1,56 a 100 µg/mL, por meio de testes de determinação da CIM e da CBM. Nossos resultados obtidos no teste de determinação da CIM (Tabela 2) permitem afirmar que os três compostos estudados são capazes de inibir o crescimento das amostras testadas. Viganor e colaboradores (2015) também demonstraram a atividade inibitória desses compostos sobre o crescimento bacteriano em amostras clínicas de *P. aeruginosa*. Os dados obtidos no trabalho citado indicaram maior eficiência de Cu-fendiona (MG-CIM = 7,76 µM), seguido de Ag-fendiona (MG-CIM = 14,05 µM) e fendiona (MG-CIM = 31,15 µM). Também em nossos resultados, o composto Cu-fendiona foi o mais efetivo em inibir a viabilidade celular das amostras (MG-CIM = 9,88 µM), seguido de Ag-fendiona (MG-CIM = 10,10µM) e fendiona (MG-CIM = 42,06 µM). Esses dados permitem afirmar que a atividade inibitória dos compostos estudados exibe potência similar em amostras de Kp-KPC e *P. aeruginosa*.

Em relação à atividade bactericida, nosso estudo é o primeiro a avaliá-la em um amplo número de amostras. Os resultados obtidos no teste de determinação da CBM (Tabela 3) indicaram boa atividade bactericida para os três compostos, com valores de MG-CBM próximos da MG-CIM. Ao contrário do observado para a atividade inibitória, para a atividade bactericida o composto Ag-fendiona foi mais efetivo do que Cu-fendiona (MG-CBM = 13,06 µM e 13,75 µM, respectivamente), ao passo que fendiona manteve-se como menos eficiente (MG-CBM = 71,27 µM). É importante salientar que para ambos os efeitos, as atividades de Cu-fendiona e Ag-fendiona foram bastante similares, não diferindo em mais que 0,7 µM. Esses dados contrastam com os resultados do estudo anterior utilizando amostras de *P. aeruginosa* (VIGANOR et al., 2015), em que a atividade inibitória de Cu-fendiona foi substancialmente mais elevada do que a de Ag-fendiona, com MG-CIM desse último superior em duas vezes a do primeiro.

Em relação à atividade dos sais $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e AgNO_3 , não foram verificados efeitos do sal de cobre sobre o crescimento bacteriano, mesmo na maior concentração testada (400,5 µM); entretanto, o sal de prata exibiu atividade considerável (MG-CIM = 52,98 µM). De fato, era esperado algum efeito de AgNO_3 , visto que compostos à base de prata têm sido historicamente utilizados como agentes antimicrobianos devido à interferência dos íons Ag^+ com processos celulares vitais, principalmente pela interação com proteínas envolvidas na síntese da parede celular e pela ligação com bases nitrogenadas utilizadas na transcrição do

DNA (THORNTON et al., 2016). Entretanto, quando comparadas as atividades referentes ao íon Ag^+ na forma de sal e complexado à fendiona, verifica-se eficiência superior desse último, com valor de MG-CIM cerca de cinco vezes menor. Assim, é coerente inferir que os efeitos bacteriostáticos e bactericidas de Ag-fendiona não decorrem da ação isolada do metal, e sim do complexo formado a partir da coordenação desse à fendiona. O mesmo é verificado para Cu-fendiona, visto que nenhuma atividade antibacteriana foi detectada para o sal contendo íons Cu^{2+} até a concentração equivalente a cerca de 40 vezes a MG-CIM do composto formado pela coordenação desse metal à fendiona. Reforçando a proposição de sinergismo entre o ligante (fendiona) e os metais (Ag^+ ou Cu^{2+}), verificam-se valores de CIM mais elevados para a fendiona quando não coordenada em comparação com essa coordenada aos metais, indicando maior efeito antibacteriano desencadeado pelos complexos metálicos.

A obtenção dos valores de CIM para os três compostos foi realizada em triplicata e, assim sendo, torna-se relevante fazer menção ao intervalo de tempo entre a execução das réplicas. As duas primeiras réplicas foram obtidas com intervalo inferior a um mês, entretanto, a última réplica foi estabelecida após intervalo superior a um ano em comparação com as primeiras. Essa condição nos permitiu constatar a manutenção dos valores de CIM por um longo período de tempo, reforçando os indícios de estabilidade nos efeitos dos compostos estudados. Esse aspecto, em adição aos relevantes efeitos antimicrobianos observados, tanto inibitórios quanto bactericidas, corroboram o potencial terapêutico dos compostos estudados.

Diversos estudos têm abordado a combinação antimicrobiana como uma alternativa terapêutica para infecções por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, propondo essa estratégia para a redução das taxas de falência terapêutica exibidas pela monoterapia (DAIKOS et al., 2014). As formulações testadas geralmente envolvem um antimicrobiano clinicamente bem estabelecido, que pode ser associado a uma ou mais substâncias (JACOBS et al., 2017; POIREL; KIEFFER; NORDMANN, 2015; TUMBARELLO et al., 2015). Desse modo, a combinação de antimicrobianos clássicos a novas substâncias com potencial terapêutico se apresenta como uma possível via para obtenção rápida de novas opções de tratamento eficazes. Tem sido demonstrado que o tratamento com regime de combinação envolvendo um carbapenêmico produz melhores desfechos contra

cepas produtoras de KPC (DAIKOS et al., 2014; TUMBARELLO et al., 2015). Por outro lado, a interação entre agentes quelantes e fármacos clássicos pode potencializar a atividade dessas, ao mesmo tempo em que reduz os níveis de toxicidade dos quelantes ao hospedeiro (SANTOS et al., 2012). Portanto, perspectivas favoráveis subsistem na combinação de fendiona e seus derivados a carbapenêmicos contra cepas de *K. pneumoniae* resistentes a essa classe de antimicrobianos. Silva (2014), em seu trabalho com *P. aeruginosa*, propôs o estudo da associação de derivados da fenantrolina com IMP e ceftazidima. Em nosso estudo, investigamos de forma mais ampla os possíveis efeitos sinérgicos advindos da combinação de antimicrobianos carbapenêmicos aos compostos fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona.

A técnica de *checkerboard* é amplamente utilizada na avaliação de combinações antimicrobianas *in vitro*, visto que proporciona a obtenção de um grande volume de resultados de forma rápida, simples, de fácil interpretação e sem custo elevado (PILLAI; MOLLERING; ELIOPOULOS, 2005). Esse método foi utilizado em nosso trabalho para avaliar 30 concentrações diferentes de cada uma das seis combinações testadas, as quais consistiram em MPM e IMP com cada um dos três compostos. Para esse teste foram utilizadas nove amostras clonalmente não relacionadas, selecionadas aleatoriamente. Em nossos resultados, os valores de ICIF encontrados para a associação dos compostos com carbapenêmicos (0,375 a 1,0) indicaram a presença apenas de efeito sinérgico ou aditivo em todas as cepas. Assim sendo, destacamos a ausência de atividade indiferente ou antagônica em qualquer uma das amostras para todas as combinações testadas. Semelhante ao que ocorreu em nosso trabalho, Silva (2014) também obteve valores de ICIF apenas nas faixas de sinergismo e aditividade, ao testar a combinação de IMP com os compostos 1,10-fenantrolina e os derivados fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona em amostras de *P. aeruginosa*. Esses dados indicam uma homogeneidade nos efeitos obtidos pela combinação dos compostos com carbapenêmicos, uma vez que, mesmo em um grande número de amostras, e em espécies distintas, nenhuma atividade negativa (indiferente ou antagônica) foi detectada.

Foi também observado em nossos resultados que as combinações de MPM com fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona exibiram sinergismo em 66,67%, 77,78% e 33,33% das amostras, respectivamente. As combinações de IMP com fendiona e Ag-fendiona apresentaram efeito sinérgico em 11,11% e 22,22% das amostras,

respectivamente; enquanto que a associação de IMP e Cu-fendiona apresentou apenas efeito aditivo para todas (100%) as amostras testadas. Procedemos, então, à aplicação de testes estatísticos, comparando os valores de ICIF das combinações entre si, para identificar acuradamente diferenças de desempenho entre as combinações testadas. Foi verificado que a associação de MPM e Cu-fendiona, aquela com maior número de amostras apresentando efeito sinérgico, diferiu significativamente de todas as combinações em que o IMP estava presente. Esse resultado, somado à proporção elevada de efeito aditivo em todas as combinações envolvendo o IMP, indicou um desempenho superior do MPM em produzir efeito sinérgico. Novamente, a utilização de testes estatísticos permitiu comprovar essa hipótese. Ao agrupar os valores de ICIF das combinações envolvendo o MPM e comparar com os valores também agrupados de ICIF das combinações contendo IMP, foi detectada diferença significativa.

Os resultados obtidos por meio do método de *checkerboard* permitem avaliar, além do efeito produzido pelas combinações, o impacto dessa associação sobre a CIM dos carbapenêmicos em amostras resistentes a esses antimicrobianos. A capacidade de conversão fenotípica de resistência para sensibilidade foi observada em 44,4% e em 33,3% das amostras quando combinadas com MPM (Figura 12) e IMP (Figura 13), respectivamente, de acordo com valores determinados pelo CLSI (2017). Entre nossas amostras, oito demonstravam CIM na faixa de resistência ao MPM ($CIM \geq 4,0 \mu\text{g/mL}$) e uma na faixa de resistência intermediária ($CIM = 2,0 \mu\text{g/mL}$). Dessas, apenas uma se manteve fenotipicamente resistente sob ação das combinações de MPM x fendiona e MPM x Ag-fendiona, e duas sob ação de MPM x Cu-fendiona. Em relação ao IMP, todas as nove amostras exibiam, inicialmente, valores CIM na faixa de resistência ($CIM \geq 4,0$). Dessas, duas se mantiveram fenotipicamente resistentes sob ação das combinações de IMP x Cu-fendiona e IMP x Ag-fendiona, quatro sob ação de IMP x fendiona. A reduzida concentração de carbapenêmicos com ação efetiva contra as amostras, quando em associação aos compostos, ratifica o potencial terapêutico dessas combinações.

A execução de testes *in vitro* para a avaliação da atividade bactericida de candidatos a agentes antibacterianos tem sido considerada como passo indispensável no processo de desenvolvimento de novos fármacos (CLSI, 1999; ZHOU et al., 2013). Para a avaliação de agentes antimicrobianos de forma isolada, é possível investigar as propriedades bactericidas por meio da determinação do MBC

pelo método de microdiluição. Quando uma combinação de agentes está sendo analisada, um método amplamente utilizado é a curva de tempo-morte, que explora as propriedades farmacodinâmicas da interação entre os constituintes da combinação por um período de tempo (GAGETTI et al., 2016; KU et al., 2017). Portanto, para a avaliação de combinações, o método de curva tempo-morte permite explorar parâmetros que não são possíveis pelo *checkerboard*, como o efeito bactericida e a potência da atividade da combinação em função do tempo (BONAPACE et al., 2000). Entretanto, o tempo requerido para a execução da técnica e a onerosidade da mesma tornam a curva tempo-morte inoportuna para testar um grande número de combinações sobre um grande número de amostras (MOLCHANOVA; HANSEN; FRANZYK, 2017). Assim, avaliamos conveniente aplicar primeiramente a técnica de *checkerboard* e, baseando-se nos seus resultados, prosseguir à execução da curva tempo-morte com um número reduzido de combinações.

A metodologia padrão para a obtenção da curva tempo-morte, conforme o recomendado pelo CLSI (1999), requer a aplicação de macrodiluição em caldo. Porém, o procedimento laborioso e o consumo excessivo da substância testada tornam o método por macrodiluição incompatível com o estudo de atividades bactericidas de compostos que ainda não são produzidos em larga escala. Assim, observa-se a emergência de uma nova metodologia, com aplicação de microdiluição em caldo, como um método mais conveniente e econômico para a determinação de curvas de morte em função do tempo (GOKARN; PAL, 2018; KAYA; ÖZBİLGE, 2012; ÖZ et al., 2016; SUN et al., 2016). Zhou e colaboradores (2013) compararam a metodologia padrão com a emergente e verificaram correspondência entre elas, estabelecendo a curva tempo-morte por microdiluição como uma boa alternativa à convencional por macrodiluição. Entretanto, no estudo acima, a medida empregada para mensurar o crescimento bacteriano no decorrer do tempo foi a densidade ótica (DO). Em testes preliminares no nosso trabalho foi verificado que a DO não se correlaciona de forma linear com o crescimento bacteriano, visto que células mortas permanecem em suspensão, sendo consideradas na leitura em espectrofotômetro da mesma forma que as células viáveis. Dessa forma, não foi possível estimar a contagem de UFC/mL a partir da DO, fazendo-se necessária a implementação de modificações à técnica descrita por Zhou e colaboradores (2013). Assim, em nossa metodologia, foi estabelecida a retirada de 10 µL de cada cultura da microplaca,

seguida de diluição em 90 μL de solução salina estéril 0,85%, gerando 100 μL de uma suspensão correspondente ao inóculo $\times 10^{-1}$. Essa suspensão foi novamente diluída na proporção de 1:10 (v/v) originando 1000 μL de uma suspensão correspondente ao inóculo $\times 10^{-2}$, a qual foi diluída seriadamente a partir de então. Três alíquotas de 20 μL de cada diluição, a partir da diluição de 10^{-2} , foram semeadas em MHA, segundo a técnica de microgota, em que o valor final de UFC/mL é obtido pela média da contagem de UFC das três gotas, após incubação (ROMEIRO, 2007).

As adaptações estabelecidas à metodologia, para aprimorar a especificidade do teste, no que se refere à determinação do inóculo bacteriano, culminaram em interferência na sensibilidade, gerando valores de contagem não passíveis de detecção. Visto que o método de curva tempo-morte por microdiluição permite semeadura das diluições das culturas apenas a partir daquela correspondente ao inóculo $\times 10^{-2}$, é possível apenas a detecção de valores superiores a 10^3 UFC/mL. Uma vez geradas as curvas de cada cultura, os critérios de interpretação dos resultados foram aplicados conforme o padronizado pelo CLSI (1999). Assim, efeito sinérgico foi definido quando houve uma redução igual ou superior a dois $\log_{10}$ na contagem de UFC/mL das amostras sob ação da combinação, quando comparada com seu constituinte mais ativo em determinado tempo. Para que os resultados fossem válidos, também foi necessário que o constituinte menos ativo tenha se mostrado inefetivo na concentração testada.

Nossos resultados obtidos previamente auxiliaram na determinação das combinações a serem avaliadas pelo método de curva tempo-morte, sendo essas: MPM x Cu-fendiona e MPM x Ag-fendiona. A seleção ocorreu com base no desempenho superior de Cu-fendiona e Ag-fendiona nos testes de determinação de CIM e CBM e na maior eficiência das combinações contando o MPM no *checkerboard*. A seleção das amostras 5B (CIM = 64 $\mu\text{g/mL}$) e 51B (CIM = 8 $\mu\text{g/mL}$) foi realizada de modo a contemplar cepas com valores de CIM para o MPM com elevada abrangência. Em relação às concentrações avaliadas, inicialmente foram testadas aquelas que originaram os menores valores de ICIF no *checkerboard* para a combinação e a amostra em questão, visto que o menor valor de ICIF indica a concentração da combinação com melhor desempenho. Os resultados obtidos para a amostra 5B indicaram inibição do crescimento sob ação tanto de MPM x Cu-fendiona (Figura 14) quanto de MPM x Ag-fendiona (Figura 15), porém pouca ou nenhuma morte foi observada. O melhor desempenho para as duas combinações foi

obtido no tempo de 6 h, com efeito sinérgico verificado apenas para a combinação MPM x Ag-fendiona nesse tempo. Sobre a amostra 51B, foi observada uma mortalidade mais expressiva sob efeito das duas combinações (Figuras 16 e 17), porém, efeito semelhante foi também observado para o MPM sozinho nas três primeiras horas. A partir de 6 h, observou-se uma diferenciação nas curvas, com maior êxito das combinações em inibir o crescimento das amostras. O melhor desempenho para as duas combinações, MPM x Cu-fendiona e MPM x Ag-fendiona, foi obtido no tempo de 9 h, sendo verificado efeito sinérgico em ambas nesse tempo. Supõe-se que a elevada CIM do MPM para amostra 5B tenha influenciado nas menores proporções de morte em comparação com a amostra 51B, pois mesmo a concentração utilizada correspondendo a $\frac{1}{4}$ x CIM para o MPM, o valor de 16 µg/mL se distancia substancialmente da CIM de 64 µg/mL. Diferentemente do que ocorre com a amostra 51B, que exibe taxas consideráveis de morte em decorrência da CIM reduzida. Portanto, em nosso estudo, das quatro concentrações que haviam demonstrado sinergismo pelo *checkerboard*, apenas três exibiram efeito sinérgico no método de curva tempo-morte, e nenhuma dessas combinações manteve sua atividade até 24 h de teste. Esses resultados foram considerados por nós como pouco satisfatórios, refletindo uma não-concordância entre os dados observados no método de *checkerboard* com a curva tempo-morte. Cappelletty e Rybak (1996) relataram em seu trabalho, comparando esses dois métodos sobre amostras de *P. aeruginosa*, quase nenhuma correlação entre eles. Estudos mais recentes, comparando métodos para testar sinergismo em diversas combinações e em distintas espécies bacterianas, encontraram resultados semelhantes, indicando que os testes de sinergismo não produzem dados comparáveis entre si (BONAPACE et al., 2000; FOWERAKER et al., 2009; PANKEY; ASHCRAFT; PATEL, 2005; SY et al., 2015). A explicação provável para a ausência de correlação entre os dados obtidos por diferentes métodos está na variação entre a complexidade e a forma de interpretação entre eles (DOERN, 2014). Em nosso trabalho, conjecturamos que a diferença entre as concentrações de inóculo iniciais utilizadas em cada técnica tenha interferido em nossos resultados, refletindo discreto efeito sinérgico e curta duração desse efeito, sendo totalmente revertido em 24 h.

Na tentativa de suprimir os efeitos advindos da diferença nas concentrações de inóculos iniciais, procedemos à realização de nova bateria de testes de curva tempo-morte, elevando as concentrações de carbapenêmico e de composto

utilizados na combinação. Foweraker e colaboradores (2009), comparando métodos de avaliação de combinações antimicrobianas em populações heterogêneas de *P. aeruginosa* multirresistentes, também adotaram para a curva tempo-morte concentrações independentes das obtidas no *checkerboard*. No trabalho em questão, foi determinado o emprego de $\frac{1}{4}$ xCIM de cada antimicrobiano. Em nosso estudo, determinamos a utilização de $\frac{1}{2}$ xCIM de cada agente da combinação. Os resultados obtidos demonstram que as novas combinações testadas foram capazes de reduzir a quantidade de UFC a valores indetectáveis, que segundo a sensibilidade do teste, situam-se abaixo de 10^3 UFC/mL. Sobre a amostra 5B, essa condição ocorreu apenas para a combinação MPM x Ag-fendiona (Figura 19), a partir do tempo de 9 h, e para a amostra 51B, ocorreu nas duas combinações (Figuras 20 e 21), a partir de 6 h de teste. No caso da combinação MPM x Cu-fendiona sobre a amostra 51B (Figura 18), conclui-se que a não detecção de contagem ocorreu pela limitação de sensibilidade da metodologia adotada, sendo observado um re-crescimento no intervalo entre 12 e 24 h. Entretanto, a combinação MPM x Ag-fendiona, após a realização de semeadura diretamente da microplaca ao final das 24 h de experimentação, provou ser capaz de erradicar as duas amostras testadas. Portanto, essa combinação demonstrou excelente efeito sinérgico, revelado pela diferença de contagem de UFC/mL em relação aos agentes sozinhos próxima a nove $\log_{10}$ em ambas as amostras, no tempo de 24 h. A combinação de MPM com Cu-fendiona também exibiu bom efeito sinérgico nas duas amostras, com redução próxima a 4 e 5 $\log_{10}$ UFC/mL, no tempo de 12 h, para as amostras 5B e 51B respectivamente. Assim, a associação do MPM com os compostos possibilita a administração desses em concentrações reduzidas caso fossem utilizados sozinhos, ao mesmo tempo em que torna o MPM eficaz contra isolados resistentes em concentração possível de ser atingida na corrente sanguínea de um indivíduo. Portanto, os efeitos observados dessas substâncias em combinação são vistos como promissores do ponto de vista clínico.

No processo de desenvolvimento de novos fármacos é crucial avaliar além da eficácia, também a segurança dos candidatos a fármaco, a fim de identificar e selecionar aqueles que apresentam perfil balanceado de segurança/eficácia (MUELLER; MILTON, 2012). Assim, depois de demonstrada *in vitro* a eficácia da formulação terapêutica proposta, torna-se necessário verificar *in vivo* sua eficácia e sua toxicidade para estabelecer um perfil de segurança/eficácia (DESBOIS; COOTE,

2012). Com objetivo de avaliar *in vivo* a atividade antimicrobiana dos compostos, inicialmente procuramos investigar os níveis de toxicidade desencadeados pelos mesmos em larvas de *G. mellonella*. Para isso, fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona foram administrados nas larvas nas concentrações de 13,33, 6,67, 3,33 e 1,67 mg/kg do animal, correspondendo a 4, 2, 1 e 0,5 µg do composto por larva respectivamente. As curvas de sobrevivência demonstraram que fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona, mesmo na maior concentração testada, não exibiram mortalidade significativa às larvas em 96 horas de monitoramento. Semelhante ao observado em nosso trabalho, boa tolerabilidade desses compostos em larvas de *G. mellonella* também foi verificada por McCann e colaboradores (2012a). No trabalho citado, concentrações superiores a 4 µg de composto por larva foram testadas, e toxicidade foi demonstrada apenas a partir de 20 µg por larva, com 80% de mortalidade. Na concentração de 10 µg por larva nenhuma mortalidade foi observada, sendo essa, portanto, considerada como a maior concentração de composto não-tóxica ao modelo utilizado.

Posteriormente, nosso grupo investigou uma possível toxicidade do MPM em concentrações de 13,33 a 3,33 mg/kg do animal, apenas para garantir que concentrações não-tóxicas desse antimicrobiano seriam utilizadas nos testes sobre a eficácia das combinações. Os resultados demonstraram que nenhuma toxicidade significativa foi provocada nas larvas pelo MPM em um período de 96 h de teste, mesmo na maior concentração testada. De forma semelhante, Benthall e colaboradores (2015) empregaram o modelo de *G. mellonella* para testar a eficácia do MPM, entre outros antimicrobianos, contra infecções causadas por culturas planctônicas e de biofilme de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Nesse trabalho, a concentração de MPM administrada correspondeu à dose recomendada para um adulto humano, portanto, 20 mg/kg, não sendo observados efeitos de toxicidade aguda nas larvas tratadas com tal concentração.

Os índices de sobrevivência das larvas frente à infecção por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC também foram examinados, como parte do processo de padronização dos testes para avaliação da eficácia das combinações. Todas as amostras bacterianas, em todas as concentrações, associaram-se a 100% de sobrevivência larvar após 4 horas de infecção. Em 48h de infecção, o inóculo de 10^6 UFC (Figura 25) foi o único capaz de provocar mortalidade significativa em todas as amostras. Semelhante ao que observamos em nosso trabalho, Benthall e

colaboradores (2015), avaliando a eficácia do MPM contra infecções por *K. pneumoniae* e verificaram que o inóculo correspondente à dose letal de 90% (LD₉₀) das larvas de *G. mellonella* foi 10⁶ UFC para sua amostra menos virulenta. Entretanto, como em nosso estudo foram selecionadas as amostras 5B e 51B para a avaliação da eficácia das combinações de MPM com composto, a concentração de inóculo selecionada foi 10⁵ UFC (Figura 24), visto que essa correspondeu à LD₉₀ de ambas as amostras.

Após a verificação da ausência de toxicidade significativa exercida por ambos os constituintes da combinação estudada e da determinação da concentração de inóculo adequada, procedeu-se à investigação dos efeitos das combinações sobre a infecção com duas amostras de *K. pneumoniae*. As larvas foram inoculadas com suspensão bacteriana contendo 10⁵ UFC e, 30 min após, foram administrados tratamento antimicrobiano ou PBS (controle) às larvas infectadas. Os tratamentos compreenderam doses de Cu-fendiona e MPM, sozinhos e combinados entre si, diluídos em PBS para obtenção da concentração correspondente a ½ xCIM de cada substância. Assim como proposto por Benthall e colaboradores (2015), nos cálculos das concentrações das substâncias de tratamento foi considerado um volume médio de hemolinfa por larva de 50 µL, e foi levado em conta o aumento de volume ocasionado pela injeção de inóculo e de tratamento. Assim, para a amostra 5B os tratamentos corresponderam a 0,4375 µg de Cu-fendiona por larva, 2,24 µg de MPM por larva e a combinação desses dois. E para a amostra 51B, os tratamentos consistiram em 0,22 µg de Cu-fendiona por larva, 0,28 µg de MPM por larva e a combinação desses. Todas as quantidades brutas de tratamento situaram-se abaixo do valor máximo avaliado nos testes de toxicidade (4 µg), e para o qual não foram verificados efeitos tóxicos.

Nossos resultados demonstraram uma superioridade estatisticamente significativa da eficácia da combinação de MPM e Cu-fendiona em comparação com ambos os constituintes sozinhos (Figuras 26 e 27). Conforme o esperado, o tratamento correspondente a ½ xCIM de Cu-fendiona, em ambas as amostras, não foi efetivo em eliminar a infecção. Entretanto, a administração de MPM em concentração correspondente a ½ xCIM foi capaz de gerar taxas de sobrevivência de 78% e 64% para as amostras 5B e 51B, respectivamente. Benthall e colaboradores (2015) relataram um fenômeno parecido ao verificar que doses de MPM e IMP, baseadas naquelas recomendadas para humanos, foram hábeis em

debelar a infecção por amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases em modelo de *G. mellonella*. Os autores desse trabalho relatam, portanto, um melhor desempenho *in vivo* dos antimicrobianos carbapenêmicos quando comparados a valores obtidos *in vitro*. Presume-se que fatores relacionados ao hospedeiro ajam em favor da atividade do antimicrobiano carbapenêmico, potencializando seu efeito. Em nosso trabalho, apesar da eficácia satisfatória do tratamento com MPM sozinho, os efeitos da combinação desse antimicrobiano com Cu-fendiona foram superiores, sendo capaz de manter a sobrevivência de 93% das larvas infectadas com a amostra 5B e 97% das infectadas com a amostra 51B. O melhor desempenho da combinação foi comprovado pela aplicação do método de Kaplan-Meier, que indicou diferença significativa entre as curvas de sobrevivência de todos os tratamentos, e dessas com a do grupo não tratado, à exceção do tratamento com Cu-fendiona, que obteve efeitos semelhantes ao grupo sem tratamento.

Comparações entre dados farmacológicos e toxicológicos devem ser realizadas assim que esses dados estiverem disponíveis, auxiliando a tomada de decisão em seguir ou não para o próximo estágio no processo de desenvolvimento de fármacos (XU; URBAN, 2011). Assim, dados de eficácia e segurança gerados *in vitro* e *in vivo* podem ser utilizados para o cálculo de um índice terapêutico (IT) preditivo do candidato a fármaco em estágio precoce no processo (MUELLER; MILTON, 2012). Baseando-se nos valores gerados a partir de estudos *in vivo*, o TI preditivo pode ser calculado como a razão entre a maior concentração da substância que não gera toxicidade e a concentração requerida para obter o efeito desejado. A partir de nossos resultados foi possível estimar o TI preditivo do composto Cu-fendiona administrado em combinação com o MPM. Consideramos que o efeito de depuração da infecção foi obtido na concentração de 1,46 mg/kg (0,4375 µg por larva) para a amostra 5B e na concentração de 0,73 mg/kg (0,22 µg por larva) para a amostra 51B. Assim, com base na maior concentração não-tóxica obtida em nosso trabalho, 13,33 mg/kg (4 µg por larva), o IT preditivo para a amostra 5B é 9,13 e para a amostra 51B é 18,26. Porém, se considerarmos os valores de toxicidade obtidos no estudo de McCann e colaboradores (2012a), que testaram concentrações superiores às nossas, sem verificar qualquer efeito tóxico em *G. mellonella* com administração de 33,33 mg/kg de Cu-fendiona, teremos valores de IT ainda maiores. Assim, um IT preditivo de 22,83 pode ser estimado para a amostra 5B e de 45,66

para a amostra 51B, indicando que os compostos quando em combinação, são capazes de desencadear o efeito terapêutico em doses de aproximadamente 23 a 46 vezes menores do que a dose considerada tóxica. A importância dessa investigação precoce de parâmetros farmacológicos preditivos, visando a identificação de características desfavoráveis, pode antecipar a realização de etapas de mitigação para que essas características sejam contornadas, ou então, o redirecionamento dos recursos para candidatos a fármaco alternativos (MUELLER; MILTON, 2012).

Para o sucesso de uma substância antimicrobiana em constituir um novo fármaco são necessárias avaliações de características referentes tanto à eficácia quanto ao perfil de segurança dessa substância. De forma geral, nossos resultados demonstraram que fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona exibem boa atividade antimicrobiana contra amostras de Kp-KPC. A eficácia da atividade desses compostos foi também verificada na utilização desses em combinação com carbapenêmicos sobre cepas de *K. pneumoniae* resistentes a esses antimicrobianos, com perfil fenotípico de MDR e produção de carbapenemase KPC. Para a administração em combinação, foi demonstrada também *in vivo* a aplicabilidade de fendiona e seus derivados como futura opção terapêutica para Kp-KPC. A toxicidade dos compostos foi avaliada *in vivo*, sendo observados resultados satisfatórios no que se refere à utilização desses sozinhos ou combinados. A partir dos dados de toxicidade obtidos, foi estimado o perfil de segurança para a administração das combinações com MPM, sendo esse considerado compatível com uma futura aplicação clínica. Assim, os resultados obtidos no nosso estudo reforçam o potencial de fendiona e seus derivados como candidatos a fármacos, podendo ser administrados sozinhos ou combinados a antimicrobianos clássicos, como os carbapenêmicos. Destacamos, contudo, a necessidade de maiores investigações sobre a eficácia desses compostos sozinhos em modelo animal e em combinação com carbapenêmicos em diferentes concentrações e maior número de amostras.

8 CONCLUSÕES

- Os compostos fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona exibem atividade antimicrobiana contra as amostras de Kp-KPC, desencadeada principalmente por efeito bactericida;
- Os compostos estudados exibem elevadas taxas de sinergismo quando combinados aos antimicrobianos carbapenêmicos IMP e MPM contra cepas de Kp-KPC; não havendo indicativos de que essa combinação possa desencadear efeitos negativos (indiferente ou antagônico);
- As combinações dos compostos Cu-fendiona e Ag-fendiona com o MPM demonstram efeito sinérgico pronunciado, mantendo sua atividade por nove a 12 horas, contra cepas de Kp-KPC; destacando-se maior eficiência da combinação de Ag-fendiona com MPM em erradicar a bactéria;
- Fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona não provocam toxicidade aguda significativa *in vivo*, conforme verificado em modelo de infecção de *G. mellonella*;
- A combinação do composto Cu-fendiona com o antimicrobiano MPM aumenta a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com Kp-KPC, quando comparada aos agentes sozinhos, sendo, portanto, eficiente em combater a infecção *in vivo* por cepas Kp-KPC.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTERMAN, R. R. et al. Sequenced dermatophyte strains: Growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. **Fungal Genetics And Biology**, v. 48, n. 3, p.335-341, 2011. Elsevier BV.

ADLER, A. et al. Effect of resistance mechanisms on the inoculum effect of carbapenem in *Klebsiella pneumoniae* isolates with borderline carbapenem resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 5014–5017, 2015.

ALBRICH, W. et al. Drug resistance in intensive care units. **Infection**, v. 27, n. 2, p.19-23, fev. 1999.

ALLEGRA, E. et al. *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. **Chemosphere**, v. 198, p. 469–472, 2018.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.

ANDRADE, E. I. et al. Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 49, n. 12, p.1-19, 2016. FapUNIFESP (SciELO).

BARTOLLETTI, F. et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 10, p.1849-1851, 2016. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

BASS, A. S. et al. Exploratory drug safety: A discovery strategy to reduce attrition in development. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 60, n. 1, p. 69–78, 2009.

BENTHALL, G. et al. Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 5, p.538-545, 2015. Elsevier BV.

BLUMENTHAL, D. K.; GARRISON, J. C. Pharmacodynamics: Molecular Mechanisms of Drug Action. In: BRUNTON, Laurence; CHABNER, Bruce;

KNOLLMAN, Bjorn. **Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics**. 12. ed. Nova Iorque: McGraw Hill Medical, 2011. Cap. 3. p. 41-72. (McGraw-Hill international editions).

BONAPACE, C. R. *et al.* Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: A comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, n. 1, p. 43–50, 2000.

BORGHI, M. **Epidemiologia e Caracterização Genética da resistência aos beta-lactâmicos em enterobactérias não susceptíveis aos carbapenêmicos**. 2017. 97 f. Tese (Doutorado) - Curso de Mestrado em Biotecnologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

BOWERS, D. R.; HUANG, V. Emerging Issues and Treatment Strategies in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE). **Current Infectious Disease Reports**, v. 18, n. 12, p.1-7, 2016. Springer Nature.

BRADFORD, P. A.. Extended-Spectrum Beta-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p.933-951, 2001. American Society for Microbiology.

BREILH, D. *et al.* Carbapenems. **Journal of Chemotherapy**, v. 25, n. 1, p. 1–17, 2013. Informa UK Limited.

BRENNAN, Marc *et al.* Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, v. 34, n. 2, p.153-157, 2002. Oxford University Press (OUP).

BROOKS, Geo. F. *et al.* **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014

BROWN, S. E. *et al.* A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, v. 39, n. 11, p.792-800, 2009. Elsevier BV.

BROWN, S. P.; CORNFORTH, Daniel M.; MIDEO, Nicole. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. **Trends In Microbiology**, v. 20, n. 7, p.336-342, 2012. Elsevier BV.

BUTLER, M. S.; BLASKOVICH, Mark At; A COOPER, Matthew. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. **The Journal Of Antibiotics**, v. 70, n. 1, p.3-24, 2016. Springer Nature.

CALBO, E.; GARAU, J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. **Future Microbiology**, v. 10, n. 6, p.1063-1075, 2015. Future Medicine Ltd.

CALFEE, D. P. Recent advances in the understanding and management of *Klebsiella pneumoniae*. **F1000Research**, v. 6, p. 1760, 2017.

CAMPOS, A. C. *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: A systematic review. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 11, p. 1374–1380, 2016.

CERQUEIRA, G. C. *et al.* Multi-institute analysis of carbapenem resistance reveals remarkable diversity, unexplained mechanisms, and limited clonal outbreaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 5, p. 1135–1140, 2017.

CHAMPION, O. L. *et al.* *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*. **Microbiology**, v. 155, n. 5, p.1516-1522, 2009. Microbiology Society.

CHEN, L. *et al.* Notes from the Field: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* - Washoe County, Nevada, 2016. **Mmwr. Morbidity And Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 1, p.33-33, 2017. Centers for Disease Control MMWR Office.

CHO, J. C. *et al.* Meropenem/Vaborbactam, the First Carbapenem/ β -Lactamase Inhibitor Combination. **Annals of Pharmacotherapy**, p. 106002801876328, 2018.

CHONG, Y.; ITO, Y.; KAMIMURA, T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 7, p.1499-1504, 2011. Elsevier BV.

CHONG, Y.; SHIMODA, S.; SHIMONO, N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, p. 185–188, 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved guideline* - 27th ed. CLSI document M26-A. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 1999.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; approved standard*. CLSI document M100. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2017.

COJUTTI, P. *et al.* Population pharmacokinetics of high-dose continuous-infusion meropenem and considerations for use in the treatment of infections due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 10, 2017.

COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP). **594085/2015**: Guideline on the use of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antimicrobial medicinal products. Londres: European Medicines Agency, 2016. 17 p.

CPREK, J. B.; GALLAGHER, J. C. Ertapenem-Containing Double-Carbapenem Therapy for Treatment of Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p.669-673, 2016. American Society for Microbiology.

CZAPLEWSKI, L. *et al.* Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 239–251, 2016.

DAIKOS, G. L. *et al.* Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections: Lowering Mortality by Antibiotic Combination Schemes and the Role of Carbapenems. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p.2322-2328, 2014. American Society for Microbiology.

DALLENNE, C. *et al.* Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p.490-495, 2010.

DAVIES, B. I. The importance of the geometric mean MIC. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 25, n. 3, p.471-472, 1990. Oxford University Press (OUP).

DESBOIS, A. P.; COOTE, Peter J. Utility of Greater Wax Moth Larva (*Galleria mellonella*) for Evaluating the Toxicity and Efficacy of New Antimicrobial Agents. **Advances In Applied Microbiology**, p.25-53, 2012. Elsevier.

DEEGAN, C. *et al.* In vitro anti-tumour effect of 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione), $[\text{Cu}(\text{phendione})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Ag}(\text{phendione})_2]\text{ClO}_4$ using human epithelial cell lines. **Chemico-Biological Interactions**, v. 164, n. 1–2, p. 115–125, 2006.

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.

DONAHUE, J. P. The Lepidoptera: Form, Function and Diversity. **Annals Of The Entomological Society Of America**, v. 88, n. 4, p.590-590, 1 jul. 1995. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aesa/88.4.590>.

DONG, C. *et al.* Synergistic Effect of Pleuromutilins with Other Antimicrobial Agents against *Staphylococcus aureus* *In Vitro* and in an Experimental *Galleria mellonella* Model. **Frontiers In Pharmacology**, v. 8, n. 553, p.1-8, 2017. Frontiers Media SA.

DORTET, L. *et al.* Trends in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2012 to 2014. **Euro Surveill**, v. 22, n. 6, p. 1–9, 2017.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA Beta-Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p.241-263, 2014. American Society for Microbiology.

FLOWERAKER, J. E. *et al.* Comparison of methods to test antibiotic combinations against heterogeneous populations of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from patients with acute infective exacerbations in cystic fibrosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4809–4815, 2009.

GAGETTI, P. *et al.* Modeling meropenem treatment, alone and in combination with daptomycin, for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains with unusually low carbapenem MICs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 5047–5050, 2016.

GANDRA, R. M. *et al.* Antifungal potential of copper(II), Manganese(II) and silver(I) 1,10-phenanthroline chelates against multidrug-resistant fungal species forming the *Candida haemulonii* Complex: Impact on the planktonic and biofilm lifestyles. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–11, 2017.

GIANNELLA, M. *et al.* Effect of combination therapy containing a high-dose carbapenem on mortality in patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 2, p.244-248, 2017. Elsevier BV.

GOKARN, K.; PAL, R. B. Activity of siderophores against drug-resistant gram-positive and gram-negative bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 61–75, 2018.

GONÇALVES, G. B. et al. Spread of multidrug-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones in a tertiary hospital from southern Brazil. **Infection, Genetics And Evolution**, v. 56, p.1-7, 2017. Elsevier BV.

GRAHAM, M. L.; PRESCOTT, M. J. The multifactorial role of the 3Rs in shifting the harm-benefit analysis in animal models of disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 19–29, 2015.

GRANATO, M. Q. et al. 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based compounds are effective in disturbing crucial physiological events of *Phialophora verrucosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, 2017.

GUENGERICH, F. P. Mechanisms of Drug Toxicity and Relevance to Pharmaceutical Development. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 26, n. 1, p. 3–14, 2011.

HUANG, D. et al. *In Vitro* Assessment of Combined Polymyxin B and Minocycline Therapy against *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) -Producing *K. pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 61, n. 7, p.1-9, 2017. American Society for Microbiology.

HUTTNER, A. et al. Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. **Antimicrobial Resistance And Infection Control**, v. 2, n. 31, p.1-13, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/2047-2994-2-31>.

IGNASIAK, K.; MAXWELL, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2017.

IOVLEVA, A.; DOI, Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Clinics In Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p.303-315, 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.005>.

JACOBS, D. M. et al. Triple combination antibiotic therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review. **Annals Of Clinical Microbiology And Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p.1-12, 2017. Springer Nature.

JANDA, J. M. The Genus *Klebsiella*: An Ever-Expanding Panorama of Infections, Disease-Associated Syndromes, and Problems for Clinical Microbiologists. **Clinical Microbiology & Case Reports**, v. 1, n. 4, p. 1–7, 2015.

JEON, J. et al. Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p.9654-9692, 2015.

JONES, C. A.; DAVIS, J. S.; LOOKE, D. F. M. Death from an untreatable infection may signal the start of the post-antibiotic era. **Medical Journal of Australia**, v. 206, n. 7, p. 292–293, 2017.

JONES, R. N. et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p.672-681, 2013. Elsevier BV.

JORGENSEN, S. C. J.; RYBAK, M. J. Meropenem and Vaborbactam: Stepping up the Battle against Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Pharmacotherapy**, p. 0–3, 2018.

KARDOS, N.; DEMAİN, A. L. Ernst Chain: a great man of science. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 97, n. 15, p.6613-6622, 2013. Springer Nature.

KARLOWSKY, J. A. et al. Resistance among Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Latin American countries: SMART 2013–2015. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p.343-348, maio 2017. Elsevier BV.

KATTAN, J. N.; VILLEGAS, M. V.; QUINN, J. P. New developments in carbapenems. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 12, p. 1102–1111, 2008.

KAUR, C. P.; VADIVELU, Jamuna; CHANDRAMATHI, Samudi. The Impact of *Klebsiella pneumoniae* in Lower Gastrointestinal Tract Diseases. **Journal Of Digestive Diseases**, p.1-19, 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-2980.12595>.

KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. **Fems Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p.101-112, 2004. Oxford University Press (OUP).

KAYA, E.; ÖZBİLGE, H. Determination of the effect of fluconazole against *Candida albicans* and *Candida glabrata* by using microbroth kinetic assay. **Turkish Journal Of Medical Sciences**, v. 42, n. 2, p.325-328, 2012.

KONEMAM, E. et al. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KU, Y. H. et al. Comparison of synergism between colistin, fosfomycin and tigecycline against extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates or with carbapenem resistance. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 6, p. 931–939, 2017.

KWADHA, C. A. et al. The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 1–17, 2017.

KWONG, E. Advancing drug discovery: A pharmaceuticals perspective. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 3, p. 865–871, 2015.

LAISHRAM, S. et al. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 1–17, 2017.

LAXMINARAYAN, R. et al. Access to effective antimicrobials: A worldwide challenge. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 168–175, 2016.

LEWIS, R. E. Using carbapenems for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* - Are we flogging a dead (work)horse antibiotic? **Virulence**, v. 8, n. 1, p. 13–14, 2016.

LIMA, A. K. C. **Efeito da 1,10-fenantrolina e seus derivados complexados em metal na atividade proteolítica de Leishmania braziliensis**. 2012. 112 f. Tese (Doutorado) - Curso de Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. Suppl 1, p. S28–S36, 2017.

LÖSCHER, W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 7, p. 1873–1888, 2017.

LOUREIRO, R. J. *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saude Publica**, v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016.

LU, A. *et al.* Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. **Frontiers In Physiology**, v. 5, p.1-15, 2014. Frontiers Media SA.

MAHON, C. R.; LEHMAN, D. C.; MANUSELIS, G. **Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5. ed. Maryland Heights: Saunders Elsevier, 2015. 1077 p.

MANIKANDAN, S. Measures of central tendency: The mean. **Journal Of Pharmacology And Pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p.140-142, 2011.

MARTENS, E.; DEMAINE, A. L. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. **Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 5, p. 520–526, 2017.

MAULDIN, P. D. *et al.* Attributable Hospital Cost and Length of Stay Associated with Health Care-Associated Infections Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p.109-115, 2009. American Society for Microbiology.

MCCANN, M. *et al.* Insights Into the Mode of Action of the Anti-Candida Activity of 1,10-Phenanthroline and its Metal Chelates. **Metal-based Drugs**, v. 7, n. 4, p.185-193, 2000.

MCCANN, M. *et al.* Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phendio)₂]ClO₄ (phendio = 1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells. **Biometals**, v. 6, n. 17, p.635-645, dez. 2004.

MCCANN, M. *et al.* In vitro and in vivo studies into the biological activities of 1,10-phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its copper(ii) and silver(i) complexes. **Toxicology Research**, v. 1, n. 1, p. 47, 2012a.

MCCANN, M. *et al.* Deciphering the Antimicrobial Activity of Phenanthroline Chelators. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2703–2714, 2012b.

MEATHERALL, B. L. *et al.* Incidence, Risk Factors, and Outcomes of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. **American Journal of Medicine**, v. 122, n. 9, p. 866–873, 2009.

MEIR, M.; GROSFELD, T.; BARKAN, D. Establishment and Validation of *Galleria mellonella* as a Novel Model Organism To Study *Mycobacterium abscessus* Infection, Pathogenesis, and Treatment. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 62, n. 4, p.792-800, 2018. American Society for Microbiology.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic Advances In Infectious Disease**, v. 3, n. 1, p.15-21, 2015. SAGE Publications.

MOLCHANOVA, N.; HANSEN, P. R.; FRANZYK, H. Advances in development of antimicrobial peptidomimetics as potential drugs. **Molecules**, v. 22, n. 9, 2017.

MORELO, N. E.; TRENTIN, D. S. *Galleria mellonella*: um hospedeiro experimental alternativo para estudos de infecções por bactérias gram-positivas. **Revista Liberato**, v. 17, n. 28, p. 1–134, 2016.

MORRILL, H. J. et al. Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p.1-15, 2015. Oxford University Press (OUP).

MUELLER, P. Y.; MILTON, M. N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 10, p. 751–761, 2012.

NATH, S. et al. In vitro and in vivo activity of single and dual antimicrobial agents against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 2, p. 431–436, 2018.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 252–275, 2017.

NICOLAU, D. P. Carbapenems: a potent class of antibiotics. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 9, n. 1, p. 23–37, 2008.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 228–236, 2009.

MYLONAKIS, E. *Galleria mellonella* and the Study of Fungal Pathogenesis: Making the Case for Another Genetically Tractable Model Host. **Mycopathologia**, v. 165, n. 1, p.1-3, 2008. Springer Nature.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **the Review on Antimicrobial Resistance**, n. May, p. 84, 2016.

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

OLSEN, R. J. et al. Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). **Virulence**, v. 2, n. 2, p.111-119, 2011. Informa UK Limited.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Ebola and Marburg virus disease epidemics: preparedness, alert, control, and evaluation**. Geneva, 2014a.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva, 2014b.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Antimicrobial Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. Geneva, 2015.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Geneva, 2017.

ÖZ, Y. et al. Time-Kill Kinetics and In Vitro Antifungal Susceptibility of Non-fumigatus *Aspergillus* Species Isolated from Patients with Ocular Mycoses. **Mycopathologia**, v. 181, n. 3–4, p. 225–233, 2016.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–661, 2016.

PADMINI, N. et al. Extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: critical tools for antibiotic resistance pattern. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 460–470, 2017.

PALANCO, A. C. *et al.* Activity of 3'-hydroxychalcone against *Cryptococcus gattii* and toxicity, and efficacy in alternative animal models. **Future microbiology**, v. 12, n. 13, p. 1123–1134, 2017.

PANKEY, G.; ASHCRAFT, D.; PATEL, N.. In Vitro Synergy of Daptomycin plus Rifampin against Enterococcus faecium Resistant to both Linezolid and Vancomycin. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p.5166-5168, 2005. American Society for Microbiology

PAPP-WALLACE, K. M. *et al.* Carbapenems: Past, present, and future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4943–4960, 2011.

PELEG, A. Y. *et al.* *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis and Therapeutics. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p.2605-2609, 2009. American Society for Microbiology.

PETROSILLO, N. *et al.* Treatment of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 2, p. 159–177, 2013.

PHILIPPON, A.; SLAMA, P.; LABIA, R. A structure-based classification of class A beta-lactamases, a broadly diverse family of enzymes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 29–57, 2016.

PIEDRA-CARRASCO, N. *et al.* Effectiveness of a Double-Carbapenem Regimen in a KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Infection in an Immunocompromised Patient. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 1, p.1-4, 2017. Mary Ann Liebert Inc.

PILLAI, S. K.; MOLLERING, R. C.; ELIOPOULLOS, G. M. Antimicrobial Combinations. In: LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine. 5. ed.** Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 365-440.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors. **Journal of clinical microbiology**, v. 11, n. 4, p. 589–603, 1998.

POIREL, L.; KIEFFER, N.; NORDMANN, P. In vitro evaluation of dual carbapenem combinations against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 156–161, 2015.

POIREL, L.; PITOUT, J. D.; NORDMANN, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future microbiology**, v. 2, n. 5, p. 501–512, 2007.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile beta-Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p.440-458, 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00001-07>.

RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 70, p. 1–7, 2012.

RAMOS-CASTAÑEDA, J. A. *et al.* Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis: Mortality due to KPC *Klebsiella pneumoniae* infections. **Journal of Infection**, 2018.

REARDON, S. WHO warns against 'post-antibiotic' era. **Nature**, 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature.2014.15135>. Disponível em: <<http://www.nature.com/news/who-warns-against-post-antibiotic-era-1.15135>>. Acesso em: 24 fev. 2018.

RELLO, J.; BUNSOW, E.; PEREZ, A. What if there were no new antibiotics? A look at alternatives. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 12, p. 1547–1555, 2016.

RICE, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 197, n. 8, p.1079-1081, 2008. Oxford University Press (OUP).

ROMEIRO, R. S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2018. Roteiro das aulas práticas.

ROY, S. *et al.* Phenanthroline derivatives with improved selectivity as DNA-targeting anticancer or antimicrobial drugs. **Chem Med Chem**, v. 3, n. 9, p. 1427–1434, 2008.

SALOMÃO, M. C. *et al.* Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in patients admitted to the emergency department: prevalence, risk factors, and acquisition rate. **Journal Of Hospital Infection**, v. 97, n. 3, p.241-246, 2017. Elsevier BV.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, Ana Cristina. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 47, p.31-37, 2016. Elsevier BV.

SANDERS, E. R. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. **Journal Of Visualized Experiments**, n. 63, p.1-18, 11 maio 2012. Jove Corporation.

SANTOS, A. L. S et al. Antimicrobial Action of Chelating Agents: Repercussions on the Microorganism Development, Virulence and Pathogenesis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2715–2737, 2012.

SANTOS, A. L. S. Perspectives to Combat Microbial Resistance. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 01, n. 01, p. 2015–2016, 2015.

SATLIN, M. J. et al. Multicenter Clinical and Molecular Epidemiological Analysis of Bacteremia Due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the CRE Epicenter of the United States. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p.1-13, 2017. American Society for Microbiology.

SCARPATE, E. D. C. B.; COSSATIS, J. J. A Presença da *Klebsiella pneumoniae* Produtora de beta-lactamase de espectro estendido no Ambiente Hospitalar. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2009.

SHARLAND, M.; SAROEY, P.; BEREZIN, E. N. The global threat of antimicrobial resistance - The need for standardized surveillance tools to define burden and develop interventions. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 5, p. 410–412, 2015.

SILVA, L. V. Produção de atributos de virulência em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*: efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre múltiplos processos biológicos. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências, Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SLATER, J. L. et al. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. **Medical Mycology**, v. 49, n. 1, p.107-113, 2011. Oxford University Press.

SOPIRALA, M. M. et al. Synergy testing by etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4678–4683, 2010.

SOTGIU, G. *et al.* Nosocomial transmission of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in an Italian university hospital: a molecular epidemiological study. **The Journal of hospital infection**, 2018.

SOULI, M. *et al.* Double-carbapenem combination as salvage therapy for untreatable infections by KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 7, p.1305-1315, 2017. Springer Nature.

STÜRCHLER, D. *Klebsiella* and Klebs the person behind the name. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 6, p. 654, 2016.

SUN, W. *et al.* Rapid antimicrobial susceptibility test for identification of new therapeutics and drug combinations against multidrug-resistant bacteria. **Emerging Microbes & Infections**, v. 5, n. 11, p. e116, 2016.

SY, C. L. *et al.* Synergy of β -Lactams with Vancomycin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Correlation of Disk Diffusion and Checkerboard Methods. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p.565-568, 2015. American Society for Microbiology.

TANG, H. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. **Fly**, v. 3, n. 1, p. 105–111, 2009.

THORNTON, L. *et al.* Water-soluble and photo-stable silver(I) dicarboxylate complexes containing 1,10-phenanthroline ligands: Antimicrobial and anticancer chemotherapeutic potential, DNA interactions and antioxidant activity. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, v. 159, p.120-132, 2016.

TSAI, C. J. Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2016.

TSAI, Y. *et al.* Single or in Combination Antimicrobial Resistance Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* Contribute to Varied Susceptibility to Different Carbapenems. **Plos One**, v. 8, n. 11, p.1-8, 2013. Public Library of Science (PLoS).

TUMBARELLO, M. *et al.* Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study—authors' response. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 10, p.2922-2922, 2015. Oxford University Press (OUP).

VADING, M. *et al.* Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–13, 2018.

VAN HARTEN, R. M. *et al.* Multidrug-Resistant Enterococcal Infections: New Compounds, Novel Antimicrobial Therapies? **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 467–479, 2017.

VERA-LEIVA, A. *et al.* KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. **Revista chilena de infectología**, v. 34, n. 5, p. 476–484, 2017.

VIGANOR, L. *et al.* Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of 1,10-phenanthroline-based drugs against both planktonic- and biofilm-growing cells. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 128–134, 2015.

VIGANOR, L. *et al.* The Antibacterial Activity of Metal Complexes Containing 1,10-phenanthroline: Potential as Alternative Therapeutics in the Era of Antibiotic Resistance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 1280–1302, 2017.

VUOTTO, C. *et al.* Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743–758, 2014.

WAND, M. E. *et al.* Complex interactions of *Klebsiella pneumoniae* with the host immune system in a *Galleria mellonella* infection model. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART 12, p. 1790–1798, 2013.

WENTAO, N. *et al.* In vitro activity of minocycline combined with aminoglycosides against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. **The Journal Of Antibiotics**, v. 71, n. 5, p.506-513, 2018. Springer Nature.

WERNLI, D. *et al.* Antimicrobial resistance: The complex challenge of measurement to inform policy and the public. **Plos Medicine**, v. 14, n. 8, p.1-9, 2017. Public Library of Science (PLoS).

MULVEY, M. R.; SIMOR, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be?. **Canadian Medical Association Journal**, v. 180, n. 4, p.408-415, 2009.

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Science**, v. 24, n. 3, p. 342–357, 2016.

XU, J. J.; URBAN, L. **Predictive Toxicology in Drug Safety**. Nova Iorque: Cambridge University Press, 2011. 389 p.

XU, L.; SUN, X.; MA, X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2017.

YANG, Haifei et al. Enhanced efficacy of imipenem-colistin combination therapy against multiple-drug-resistant *Enterobacter cloacae*: *in vitro* activity and a *Galleria mellonella* model. **Journal Of Microbiology, Immunology And Infection**, v. 51, n. 1, p.70-75, 2018. Elsevier BV.

YU, W. et al. In vitro antibacterial activity of fosfomycin combined with other antimicrobials against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 2, p. 237–241, 2017.

ZHOU, X. et al. Synergistic effects of Chinese herbal medicine: A comprehensive review of methodology and current research. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 201, p. 1–16, 2016.

ZHOU, Y. et al. Comparison of microplate and macrodilution methods in time-kill study of new antimicrobial drugs. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 1, p. 9–16, 2013.

ZURFLUH, K. et al. Screening for fecal carriage of MCR-producing Enterobacteriaceae in healthy humans and primary care patients. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 7–10, 2017.

ANEXO A – VISÃO GERAL DOS DADOS DE SUSCETIBILIDADE AOS CARBAPENÊMICOS E PERFIL GENÉTICO DAS 46 AMOSTRAS DE *K. pneumoniae*

Amostra	Sítio de Isolamento	PCR											GES
		IMP	VIM	KPC	TEM	SHV	OXA-1-like	CTX-M gp1	CTX-M gp2	CTX-M gp9	CTX-M gp8/25	OXA-48-like	
2B	Urina	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4B	Urina	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
5B	Swab retal	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10B	Urina	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11B	Secreção de abscesso	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
15B	Urina	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
17B	Secreção de ferida	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
19B	Ponta de cateter	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
26B	Sangue	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
29B	Urina	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
31B	Urina	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
33B	Urina	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
35B	Ponta de cateter	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
36B	Swab nasal	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
40B	Sangue	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-

(Continua)

(Continuação)

43B	Urina	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
45B	Aspirado traqueal	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
46B	Sangue	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
47B	Aspirado traqueal	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
51B	Swab retal	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
55B	Secreção abdominal	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
56B	Sangue	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
62B	Swab de ferida	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
63B	Ponta de cateter	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
69B	Sangue	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
79B	Abscesso hepático	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
81B	Sangue	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
82B	Swab retal	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
83B	Urina	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
84B	Fragmento ósseo	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
85B	Sangue	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
87B	Urina	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
88B	Urina	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
89B	Ponta de cateter	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

(Continua)

(continuação)

90B	Secreção de ferida	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
91B	Ponta de cateter	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
100B	Líquido peritonal	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
104B	Secreção traqueal	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
105B	Sangue	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
115B	Sangue	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
116B	Sangue	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
118B	Sangue	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
119B	Urina	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
120B	Urina	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
124B	Sangue	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
126B	Ponta de cateter	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-