

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

ROBERTA FERREIRA VENTURA MENDES

**EFEITO DE DERIVADOS DE 1,10-FENANTROLINA SOBRE
CEPAS DE *Acinetobacter baumannii* PRODUTORAS DE
CARBAPENEMASES**

VITÓRIA, ES

2019

ROBERTA FERREIRA VENTURA MENDES

**EFEITO DE DERIVADOS DE 1,10-FENANTROLINA SOBRE
CEPAS DE *Acinetobacter baumannii* PRODUTORAS DE
CARBAPENEMASES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo como pré-requisito para obtenção do título de Doutor (a) em Doenças Infecciosas.

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

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

VITÓRIA, ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M538e Mendes, Roberta Ferreira Ventura, 1982-
Efeito de derivados de 1,10-fenantrolina sobre cepas de *Acinetobacter baumannii* produtoras de carbapenemases / Roberta Ferreira Ventura Mendes. - 2019.
110 f. : il.

Orientadora: Ana Paula Ferreira Nunes.
Coorientador: André Luis Souza dos Santos.
Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Acinetobacter baumannii*. 2. resistência a fármacos. 3. 1,10-fenantrolina. 4. *Galleria mellonella*. 5. camundongo. 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 TESE DE DOUTORADO

A doutoranda Roberta Ferreira Ventura Mendes apresentou a tese intitulada “EFEITO DA 1,10-FENANTROLINA E SEUS DERIVADOS SOBRE AMOSTRAS DE *ACINETOBACTER BAUMANNII* PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutor(a) 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 tese habilitando Roberta Ferreira Ventura Mendes a obter o grau de doutor(a) em doenças infecciosas.

Vitória - ES, 31 de outubro de 2019.

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima

Pereira/UFES

(Membro Interno)

Profa. Dra. Liliانا Cruz Spano/UFES

(Membro Interno)

Prof. Dr. Rodrigo Cayô da Silva/UNIFESP

(Membro Externo)

Profa. Dra. Juliana Alves Resende/UFES

(Membro Externo)

DEDICATÓRIA

Desde que entrei na Universidade me encantei com o mundo microscópico e foi amor à primeira bactéria! Apesar de não ter cursado ainda, naquele momento, nenhuma disciplina de microbiologia, fui bater a porta do professor Dr. José Vitor Moreira Lima Filho, que depois muita insistência, frequentando o LAMIN/UFRPE escondido, aceitou-me para fazer parte da sua equipe de pesquisa. Onde comecei a trilhar esse caminho árduo e saboroso do conhecimento. Só tenho a agradecer todos os ensinamentos, sem dúvida, a sua orientação foi essencial para a minha vida acadêmica. Obrigada por todas as oportunidades!

E para fechar um ciclo que foi aberto lá em 2003, deparo me fazendo parte de um Laboratório de Resistencia Microbiana RESBAC/UFES, sendo orientada por uma mulher, professora Dra. Ana Paula ferreira Nunes, que é exemplo de determinação, seriedade, trabalho e confiança, a qual me inspirou durante esses quatro anos a ser uma profissional melhor, que me ensinou a gostar ainda mais do que eu escolhi fazer lá atrás. Logo, dedico esse trabalho a esses dois exemplos de profissionais que tanto admiro.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todos os momentos vividos, pelas oportunidades concedidas, nas quais conheci pessoas inesquecíveis e tive experiências únicas.

Aos meus pais por terem me dado o dom da vida e por terem sido meu forte, meu auxílio e por terem me ensinado valores. Pelo amor, carinho e cuidado que sempre me dedicaram.

As minhas irmãs, Andréa, Fernanda e Renata por serem as melhores irmãs do mundo, pelo amor, companheirismo e estímulo que me dão, mesmo que distantes e as minhas sobrinhas Samantha e Sophia, por serem meu pedacinho de Céu.

À Fabrício, pelo amor e companheirismo, por ser minha fonte de forças e meu refúgio nos momentos de aperreio.

Aos amigos do RESBAC, Jaqueline, Ingrid, Ana Carla, Pedro, Bianca, Luiz Felipe e Ana Paula, pelos momentos e conhecimentos compartilhados, sem vocês nada disso seria possível! Obrigada pela companhia nos experimentos de *Time-Kill*, apesar de cansativo, foi muito divertido!

A professora Ana Paula, por toda a acolhida, confiança, companheirismo, críticas e carinho contribuindo em muito na pessoa e na profissional que sou hoje. Ao professor André Luis, pela receptividade em seu laboratório, agradeço ainda pelo apoio e orientação e por ter sido solícito em todos os momentos. Sua coorientação foi fundamental! À Anna Clara por toda ajuda nesse trabalho e pela amizade construída.

À professora Blima Fux, pelos conhecimentos transmitidos e apoio constante. Agradeço por ter embarcado comigo nos testes com os camundongos.

Aos colegas do LabCAs e LabVig, pelos bons momentos e lembranças que certamente levaremos conosco. Ao professor Ricardo Schuenck, pela parceria e pela concessão das amostras utilizadas no meu estudo.

Aos técnicos e servidores do setor de microbiologia da UFES, por toda 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.

Ao CEUA/UFES pela concessão dos camungondos para a realização desse trabalho e em especial a Argentina Gouvêia e ao médico veterinário Rodolpho Barros por todo o suporte com os documentos e animais.

Aos professores participantes da banca, por disponibilizarem parte do seu tempo para contribuir para melhoria deste trabalho.

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).

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.
Muito obrigada!

RESUMO

As opções terapêuticas estão ficando limitadas para pacientes infectados com *Acinetobacter baumannii* devido ao aumento da resistência a agentes antimicrobianos comumente usados, como por exemplo, os carbapenêmicos. O desenvolvimento de novos antimicrobianos passou a ser prioritário. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do 1,10-fenantrolina e seus derivados, fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona, sozinhos e combinados a carbapenêmicos em diferentes amostras de *A. Baumannii* produtoras de carbapenemases. Para tal foram investigados: (i) a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos compostos, meropenem (MPM) e imipenem (IMP); (ii) o efeito da combinação dos compostos com MPM e IMP por *checkerboard* e curva tempo-morte; (iii) o efeito de combinações em modelo de *Galleria mellonella* e (iv) o efeito do Ag-fendiona em modelo de camundongos. Os resultados obtidos pela determinação da CIM e da CBM demonstraram excelente atividade antimicrobiana pelos quatro compostos contra todas as amostras (n=26). Os valores médios da CIM de 1,10-fenantrolina, fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona foram 12,98, 1,98, 1,56 e 1,56 µg/ml, respectivamente. Por meio do *checkerboard* foi verificada ação sinérgica e de aditividade nas combinações dos compostos com IMP e aditividade quando combinado com MPM. Pelo método de curva tempo-morte foi demonstrado que as combinações contendo $\frac{1}{2}$ x CIM de Ag-fendiona ou Cu-fendiona produziram efeito aditivo por 6 horas. Observou-se que a combinação de MPM com Ag-fendiona foi capaz de erradicar as células bacterianas. Ag-fendiona e Cu-fendiona apresentaram efeito bactericida em 6 horas, porém não foi de maneira dose-dependente. A combinação do composto Ag-fendiona com MPM mostrou superioridade estaticamente significativa em relação aos agentes sozinhos em modelo de *G. mellonella*. O composto Ag-fendiona foi capaz de reduzir a infecção provocada por *A. baumannii* em um modelo de infecção em camundongos na concentração de 75 µg/kg. O tratamento com $\frac{1}{2}$ xCIM de 1,10-fenantrolina e seus derivados inibiu aproximadamente 68% da biomassa e 60% da viabilidade celular de *A. baumannii* em biofilme. Assim, os resultados obtidos demonstram o potencial de 1,10-fenantrolina, fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona como candidatos a fármacos sozinhos ou combinados a antimicrobianos carbapenêmicos para *A. baumannii*.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*, resistência a fármacos, 1,10-fenantrolina,

fendiona, Cu-fendiona, Ag-fendiona, Sinergismo de fármacos, *Galleria mellonella*.
Camundongo.

ABSTRACT

Therapeutic options are becoming limited for patients infected with *Acinetobacter baumannii* due to increased resistance to commonly used antimicrobial agents, such as carbapenems. The development of new antimicrobials became a priority. In this sense, the present study aimed to evaluate the effects of 1,10-phenanthroline and its derivatives, fendione, Cu-fendione and Ag-fendione, alone and combined with carbapenems in different strains of *A. Baumannii* producing carbapenemases. For this purpose were investigated: (i) the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (CBM) of the compounds, meropenem (MPM) and imipenem (IMP); (ii) the effect of combining the compounds with MPM and IMP by *checkerboard* and *time-kill curve*; (iii) the effect of combinations in a *Galleria mellonella* model and (iv) the effect of Ag-fendione in a mouse model. The results obtained by determining MIC and CBM demonstrated excellent antimicrobial activity by the four compounds against all strains (n=26). The mean MIC values of 1,10-phenanthroline, fendione, Cu-fendione and Ag-fendione were 12.98, 1.98, 1.56 and 1.56 µg / ml, respectively. Through the *checkerboard*, synergistic and additive action was verified in the combinations of compounds with IMP and additivity when combined with MPM. The *time-kill* curve method showed that combinations containing $\frac{1}{2}$ x MIC of Ag-fendione or Cu-fendione produced an additive effect for 6 hours. It was observed that the combination of MPM with Ag-fendione was able to eradicate bacterial cells. Ag-fendione and Cu-fendione showed bactericidal effect in 6 hours, but it was not dose-dependent. The combination of the compound Ag-fendione with MPM showed statistically significant superiority in relation to the agents alone in a model of *G. mellonella*. The compound Ag-fendione was able to reduce the infection caused by *A. baumannii* in a model of infection in mice at a concentration of 75 µg / kg. Treatment with $\frac{1}{2}$ x CMI of 1,10-phenanthroline and its derivatives inhibited approximately 68% of the biomass and 60% of the cell viability of *A. baumannii* in biofilm. Thus, the results obtained demonstrate the potential of 1,10-phenanthroline, fendione, Cu-fendione and Ag-fendione as drug candidates alone or combined with carbapenemic antimicrobials for *A. baumannii*.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, drug-resistance, 1,10-phenanthroline, fendione, Cu-fendione, Ag-fendione, drug-synergism, *Galleria mellonella*. Mouse.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Antimicrobianos beta-lactâmicos.....	26
Figura 2: Estrutura química da 1,10-fenantrolina e seus derivados: 1,10- fenantrolina-5,6-diona (fendiona), Ag-fendiona e Cu-fendiona.....	33
Figura 3: Fluxograma dos experimentos realizados para a avaliação da atividade antimicrobiana de 1,10 fenantrolina e seus derivados de forma isolada e combinada a carbapenêmicos em 26 amostras de <i>A. baumannii</i>	39
Figura 4: Representação esquemática dos possíveis resultados apresentados por combinações de dois compostos com atividade antimicrobiana pelo método de <i>checkerboard</i>	44
Figura 5: Inoculação em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	48
Figura 6: Inoculação em camundongos.....	50
Figura 7: Curva dose-resposta das amostras clínicas de <i>A. baumannii</i> tratadas com as concentrações $\frac{1}{4}$ x CIM, 1 x CIM, 4 x CIM e 16 x CIM do Cu-fendiona.....	60
Figura 8: Curva dose-resposta das amostras clínicas de <i>A. baumannii</i> tratadas com as concentrações $\frac{1}{4}$ x CIM, 1 x CIM, 4 x CIM e 16 x CIM do Ag-fendiona.....	61
Figura 9: Curva tempo-morte das amostras clínicas de <i>A. baumannii</i> tratadas com as combinações de MPM x Cu-fendiona.....	69
Figura 10: Curva tempo-morte das amostras clínicas de <i>A. baumannii</i> tratadas com as combinações de MPM x Ag-fendiona.....	70
Figura 11: Taxas de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com inóculo de <i>A. baumannii</i> em concentração de 10^4 UFC/mL.....	71
Figura 12: Taxas de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com inóculo de <i>A. baumannii</i> em concentração de 10^5 UFC/mL.....	72
Figura 13: Taxas de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com inóculo de <i>A. baumannii</i> em concentração de 10^6 UFC/mL.....	72
Figura 14: Taxas de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com a	

amostra 30B e posteriormente tratadas com MPM, Cu-fendiona e Ag-fendiona sozinhos e combinados entre si.	74
Figura 15: Taxas de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com a amostra 98B e posteriormente tratadas com MPM, Cu-fendiona e Ag-fendiona sozinhos e combinados entre si.	75
Figura 16: Alterações fisiológicas e comportamentais dos camundongos	76
Figura 17: Taxas de sobrevivência de camundongos infectados com inóculo de <i>A. baumannii</i>	77
Figura 18: Taxa de sobrevivência de camundongos tratados com Ag-fendiona no modelo de peritonite induzido pela cepa 98B de <i>A. baumannii</i>	78
Figura 19: Efeito do Ag-fendiona nos animais.....	80
Figura 20: Efeito do Ag-fendiona no sangue e fluido peritoneal dos animais.	81
Figura 21: Análise da formação de biofilme por diferentes amostras clínicas de <i>A. baumannii</i>	83
Figura 22: Intensidade de formação de biofilme em diferentes amostras clínicas de <i>A. baumannii</i>	83
Figura 23: Efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados na formação de biofilmes por 26 amostras de <i>A. baumannii</i>	84
Figura 24: Efeitos da 1,10-fenantrolina, fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona sobre o biofilme maduro formado por <i>A. baumannii</i>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos genes das 26 amostras de <i>A. baumannii</i>	37
Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) dos carbapenêmicos e compostos nos isolados clínicos <i>A. baumannii</i>	58
Tabela 3. Valores de CBM e MG-CIM de 1,10-fenantrolina e seus derivados no crescimento das amostras de <i>A. baumannii</i>	58
Tabela 4. Efeito da associação de MPM com fendiona por meio do método de <i>checkerboard</i> sobre amostras de <i>A. baumannii</i>	63
Tabela 5. Efeito da associação de MPM com Ag-fendiona por meio do método de <i>checkerboard</i> sobre amostras de <i>A. baumannii</i>	64
Tabela 6. Efeito da associação de meropenem com Cu-fendiona por meio do método de <i>checkerboard</i> sobre amostras de <i>A. baumannii</i>	65
Tabela 7. Efeito da associação de IMP com fendiona por meio do método de <i>checkerboard</i> sobre amostras de <i>A. baumannii</i>	66
Tabela 8. Efeito da associação de IMP com Ag-fendiona por meio do método de <i>checkerboard</i> sobre amostras de <i>A. baumannii</i>	67
Tabela 9. Efeito da associação de IMP com Cu-fendiona por meio do método de <i>checkerboard</i> sobre amostras de <i>A. baumannii</i>	68
Tabela 10. Contagem total e diferencial de leucócitos em esfregaço do sangue periférico de animais controles e experimentais após infecção por <i>Acinetobacter baumannii</i>	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. baumannii - *Acinetobacter baumannii*

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

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

CO₂ - dióxido de carbono

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

CuSO₄ – Sulfato de Cobre

DHA-1 - do inglês *Dhahran Hospital in Saudi Arabia*

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

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
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* produtora de carbapenemase
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
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
RAM – Resistência Antimicrobiana
RESBAC - Laboratório de Resistência Antimicrobiana
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	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 <i>Acinetobacter spp.</i>	23
2.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	24
2.3 Carbapenêmicos.	26
2.4 Mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos	27
2.5 <i>Acinetobacter baumannii</i> produtora de carbapenemases	30
2.6 Opções terapêuticas para infecções por <i>Acinetobacter baumannii</i> produtora de carbapenemases.....	31
2.7 1,10-fenantrolina e seus derivados.....	32
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 OBJETIVO GERAL	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1 Amostras bacterianas.....	37
5.2 Compostos	38
5.3 Delineamento Experimental	38
5.4 Identificação fenotípica.....	40
5.5 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos	40
5.6 Método de disco combinado para detecção de <i>Metallo-beta-lactamase</i>	41
5.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo dos carbapenêmicos.....	41
5.8 Efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre o crescimento das amostras de <i>A. baumannii</i>	42
5.8.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	42
5.8.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	43
5.8.3 Curva dose-resposta.....	43

5.9 Efeitos de fendiona e seus derivados combinados a carbapenêmicos sobre o crescimento das amostras de <i>A. baumannii</i>	43
5.9.1 Método <i>Checkerboard</i>	43
5.9.2 Curva de tempo-morte	45
5.10 Efeitos de fendiona e seus derivados sozinhos ou em combinação a carbapenêmicos em modelo in vivo de <i>G. mellonella</i>	46
5.10.1 Criação e manutenção das larvas de <i>G. mellonella</i>	46
5.10.2 Teste de toxicidade <i>in vivo</i> de fendiona e seus derivados e do MPM.....	47
5.10.3 Infecção e índice de sobrevivência.	47
5.10.4 Avaliação dos efeitos das combinações antimicrobianas em modelo de infecção de <i>G. mellonella</i>	49
5.11 Efeitos do Ag-fendiona em modelo de infecção peritoneal em camundongos ..	49
5.11.1 Aspectos éticos e animais	49
5.11.2 Determinação da DL ₅₀ e sobrevivência.....	50
5.11.3 Teste de toxicidade aguda em camundongos.....	50
5.11.4 Desenho experimental	51
5.11.5 Determinação da carga bacteriana	51
5.11.6 Contagem total e diferencial de leucócitos	51
5.12 Efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre a formação do biofilme....	52
5.12.1 Produção de Biofilme por cepas de <i>A. baumannii</i>	52
5.12.2 Avaliação da ação 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre a formação do biofilme.....	53
5.12.3 Avaliação da ação 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre a viabilidade metabólica e cepas de <i>A. baumannii</i> em biofilme.....	53
5.13 Efeito da 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre desarticulação do biofilme maduro	54
5.14 Estatísticas e correlações.....	54
6 RESULTADOS	56

6.1 Identificação fenotípica.....	56
6.2 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	56
6.3 Detecção de <i>MBL</i>	56
6.4 Determinação da CIM dos Carbapenêmicos.....	57
6.5 Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre o crescimento das amostras de <i>A. baumannii</i>	57
6.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	57
6.5.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	58
6.5.3 Curva de dose-resposta.....	59
6.6 Efeitos fendiona e seus derivados sozinhos ou em combinação a carbapenêmicos.....	62
6.6.1 Método <i>Checkerboard</i>	62
6.6.2 – Curva de tempo-morte	69
6.7 Efeitos fendiona e seus derivados sozinhos ou em combinação a carbapenêmicos em modelo invertebrado de <i>G. mellonella</i>	70
6.7.1 Teste de toxicidade de fendiona e seus derivados e do MPM	70
6.7.2 Infecção e índice de sobrevivência	71
6.7.3 Avaliação dos efeitos das combinações antimicrobianas através do modelo de infecção em <i>G. mellonella</i>	73
6.8 Efeitos do Ag-fendiona em modelo através de modelo de infecção peritoneal em camundongos.....	75
6.8.1 Teste de toxicidade do Ag-fendiona.....	75
6.8.2 Determinação da DL ₅₀ e sobrevivência pós-infecção.....	76
6.8.3 Avaliação do tratamento com Ag-fendiona em modelo de infecção peritoneal por <i>A. baumannii</i> em camundongos.....	78
6.8.4 Quantificação de bactérias no sangue, fluido peritoneal, baço e fígado dos animais.....	79
6.8.5 Contagem total e diferencial de leucócitos.....	81
6.9 Formação de biofilme	83
6.9.1 Efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados na formação	

de Biofilmes.....	84
6.9.2 Efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados na desarticulação de biofilme aduro.....	85
7 DISCUSSÃO	86
8 CONCLUSÕES	98
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares tornaram-se uma das maiores ameaças para a saúde dos pacientes, sendo maior nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (GONZALEZ et al., 2014). A resistência dos microrganismos aos antimicrobianos tem provocado um aumento da morbidade e mortalidade por infecções, tempo de internação e uso de antimicrobianos, sendo esse último, pelo uso indiscriminado, que determinam o aparecimento de diferentes mecanismos de resistência único ou múltiplo em patógenos tradicionais (HARBARTH & SAMORE, 2005; LOPÉZ et al., 2013). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou uma lista contendo as bactérias resistentes aos antimicrobianos considerados como patógenos de prioridade global, visando auxiliar a priorização de pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos antimicrobianos eficazes contra tais bactérias. Os patógenos foram agrupados de acordo com a espécie e o tipo de resistência, gerando resultados estratificados em três níveis de prioridade. No grupo mais alarmante encontram-se bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos que representam uma ameaça particular em hospitais, casas de repouso e entre pacientes cujos cuidados exigem dispositivos como ventiladores mecânicos e cateteres sanguíneos. Neste grupo estão incluídas *Acinetobacter baumannii*, apresentando resistência principalmente a carbapenêmicos (WHO, 2017).

A. baumannii está particularmente associado a infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) podendo causar pneumonia grave, meningite e infecções do trato urinário, circulação sanguínea e outras partes do corpo (AL-GETHAMY et al., 2017). Além disso, esses isolados apresentam grande versatilidade metabólica, adquirindo habilidades de adaptação ou resistência a condições hostis em superfícies bióticas e abióticas por longos períodos e a capacidade de expressar importantes fatores de virulência para estabelecer uma infecção. A formação de biofilmes é uma estratégia efetiva para aumentar a sobrevivência bacteriana e a sua persistência em condições de estresse seguindo tratamento antimicrobiano ou condições ambientais (BARDBARI et al., 2017).

Desde 2013, *A. baumannii* resistente a múltiplas drogas (MDR) é considerado como uma ameaça grave pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), EUA. Pela estimativa do CDC, *A. baumannii* é responsável por cerca de 12.000

infecções, sendo 7.300 por cepas MDR com cerca de 500 mortes anualmente (CDC 2013). Um estudo realizado pelo *Center for Disease Dynamics, Economics & Policy* (CDDEP), EUA, em pacientes internados no ano de 2014, mostrou que a resistência de *A. baumannii* a carbapenêmicos foi de 49% nos EUA, 97% no México, 74% na África do Sul e 84% na Índia (CDDEP, 2016). No Brasil, a ANVISA realizou um estudo similar através da Rede de Resistência Microbiana (RM), envolvendo hospitais que notificaram a ocorrência de infecções primárias da corrente sanguínea em pacientes de UTIs mostrando que a taxa de resistência do *A. baumannii* aos carbapenêmicos em 2015 foi de 77,4% (ANVISA, 2015).

Tal panorama faz com que seja necessário o uso de outras classes de antimicrobianos, o que nem sempre é possível devido à possibilidade de resistência ou ineficiência terapêutica. Ainda, existe uma escassez de novos fármacos para bacilos gram negativos (BGN) (TILLOTSON, 2008) e a combinação de antimicrobianos que alcancem efeitos sinérgicos aparece como uma alternativa viável e imediata. A pesquisa por novos agentes antimicrobianos ou novas terapias tem se tornado imprescindível devido à resistência adquirida por vários microrganismos patogênicos que tem tornado a terapia antimicrobiana ineficaz. O aumento crescente das taxas de resistência devido, principalmente, ao uso excessivo e incorreto de antimicrobianos tem sido alarmante. Se a situação não for revertida, estima-se que 10 milhões de pessoas morrerão anualmente de infecções por agentes patogênicos multirresistentes até 2050, configurando um cenário similar ao da era pré-antibiótica (MENDELSON, 2015). Com a emergência de patógenos MDR (sigla do inglês “multidrug resistant”) em IRAS, os antimicrobianos descobertos nas últimas décadas não são suficientes para eliminá-los, com isso estão sendo propostas novas formulações e fazendo com que fármacos a base de metais ganhem destaque como uma possível alternativa terapêutica (LEMIRE et al., 2013; HOBMAN & CROSSMAN, 2014; VIGANOR et al., 2016).

Na busca de novos complexos mais efetivos e com menos efeitos colaterais McCANN e colaboradores (2004) sintetizaram, a partir da 1,10-fenantrolina, três novos compostos: 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), $[Ag(fendiona)_2]ClO_4$ (Ag-fendiona) e $[Cu(fendiona)_3](ClO_4)_2 \cdot 4H_2O$ (Cu-fendiona). Estes compostos derivados da 1,10-fenantrolina alteraram o funcionamento de uma grande variedade de sistemas biológicos 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), *K. pneumoniae* (PEREGRINO, 2018). Portanto, por serem compostos bioativos capazes de alterar funções e sobrevivência de diversos microrganismos patogênicos, somados ao baixo perfil de toxidez destes compostos a larvas e camundongos, a 1,10- fenantrolina e seus derivados tornam-se potenciais representantes de uma nova classe de agentes antimicrobianos (SANTOS et al., 2012).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Acinetobacter* spp

A história do gênero *Acinetobacter* começou no início do século 20, em 1911, quando Beijerinck, um microbiologista holandês, descreveu um organismo chamado *Micrococcus calco-aceticus* isolado do solo por enriquecimento em meio mínimo contendo acetato de cálcio (BEIJERINCK, 1911; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Apenas em 1954, para diferenciá-lo dos organismos móveis dentro do gênero *Achromobacter*, Brisou e Prévot (1954) nomearam o atual gênero *Acinetobacter* que deriva das palavras gregas “ακίνητο” que significa não móvel e “bakter” de bactéria, para distingui-los dos microrganismos móveis dentro do gênero *Achromobacter*. No entanto, essa designação do gênero só foi aceita em 1968 após Baumann e colaboradores (1968) publicarem um amplo estudo de microrganismos como *Micrococcus calco-aceticus*, *Alcaligenes hemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella lwoffii*, *Herellea vaginicola* e *Bacterium anitratum*, onde chegaram a conclusão que pertenciam a um único gênero e não podiam ser subclassificadas em espécies diferentes com base em características fenotípicas. O reconhecimento do gênero *Acinetobacter* só foi oficializado em 1971 no Subcomitê de Taxonomia de *Moraxella* e Bactérias Relacionadas (HOWARD et al., 2012).

Atualmente o gênero *Acinetobacter* é classificado no reino *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Pseudomonales* e família *Moraxellaceae* (VANECHOUTTE et al., 2011) e compreende bactérias gram-negativas, estritamente aeróbicas, não fermentadoras, não fastidiosas, motilidade negativa, catalase positiva e oxidase-negativas, com um conteúdo de DNA G + C de 39% a 47% (PELEG et al., 2008). Até o momento, 63 espécies com nomes válidos podiam ser encontradas na Lista de nomes procariontes com posição na nomenclatura LPSN, (www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html), e outras estão aguardando para validação. O desafio na taxonomia de *Acinetobacter* é devido aos aglomerados de espécies intimamente relacionadas que são difíceis de distinguir usando características fenotípicas e métodos quimiotaxonômicos. O complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (ABC) compreendendo *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. dijkshoorniae* e *A. nosocomialis* estão intimamente relacionadas e são difíceis de distinguir entre si por propriedades fenotípicas, sendo

necessário métodos genotípicos (MATEO-ESTRADA et al., 2019). Apesar do *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis* apresentarem na última década uma importância clínica significativa no cenário hospitalar, as infecções por *A. baumannii* apresentam uma maior relevância devido sua capacidade de persistir no ambiente hospitalar e pelo alto índice de cepas isoladas apresentando resistência a múltiplos antimicrobianos (MDR do inglês “Multidrug Resistant”) (MACCONNELL; ACTIS; PACHÒN, 2013). O gênero *Acinetobacter* possui uma capacidade de sobreviver em superfície secas similares ao ambiente hospitalar, o que pode ocasionar a contaminação da pele de pacientes e profissionais de saúde levando a transmissão de isolados e surtos. Apesar dos membros do gênero *Acinetobacter* estarem presentes na água, solo, vegetais pele e fezes humanas, o *A. baumannii* curiosamente não possui habitat natural fora do hospital, sendo isolados de pacientes e ambientes hospitalares durante surtos (HARDING et al., 2013)

2.2 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii é um patógeno gram-negativo oportunista que surgiu nas últimas décadas como uma causa mundial de infecções hospitalares associadas à elevada morbimortalidade (WONG et al., 2017). A preocupação se alastra no mundo todo devido *A. baumannii* sobreviver longos períodos em ambiente hospitalar, em superfícies úmidas e inóspitas, adaptando-se a condições adversas que promove elevada morbidade e mortalidade além de possuir resistência a vários antimicrobianos (PELEG et al., 2009). Na maioria dos casos, acredita-se que as infecções sejam adquiridas após a exposição a *A. baumannii* que persiste em equipamentos hospitalares contaminados ou pelo contato com profissionais de saúde que foram expostos ao organismo através do contato com um paciente colonizado (RODRÍGUEZ-BANÓ et al., 2009). *A. baumannii* possui altos níveis de resistência intrínseca a vários antibióticos, incrementada por uma predisposição para adquirir genes de resistência a antimicrobianos (RUNNEGAR et al., 2010). Nos últimos anos, a resistência aumentou rapidamente e a disponibilidade de técnicas de epidemiologia molecular tem sido usada para estabelecer novas estratégias para controlar a disseminação de *A. baumannii* resistente (CIESLINSKI et al., 2013), gerando novos patógenos mais complexos para o tratamento e representam desafios importantes para a terapêutica. Com todos esses aparatos, *A. baumannii* ganhou

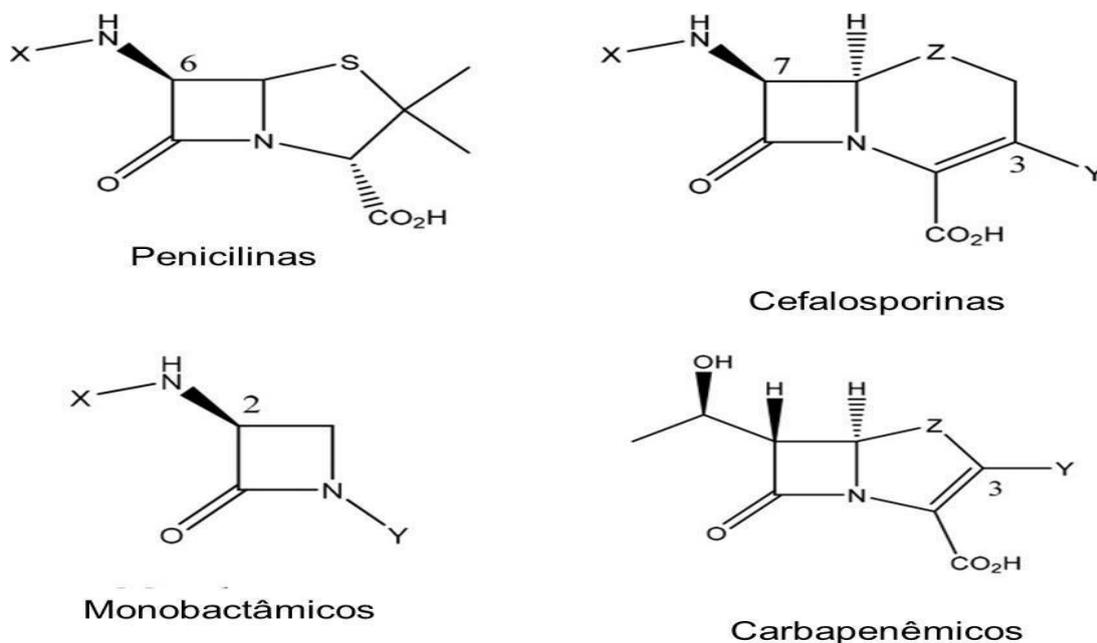
atenção e faz parte do grupo de bactérias patogênicas com crescente resistência e virulência a múltiplos fármacos, são os patógenos “ESKAPE”, representados por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*. Esses patógenos representam novos paradigmas na patogênese, transmissão e resistência e possuem a capacidade de "escapar" da atividade dos antimicrobianos (PENDLETON; GORMAN; GILMORE, 2013). *A. baumannii* é intrinsecamente resistente a antibióticos, devido à proteção proporcionada por uma membrana externa gram-negativa, sistemas de bomba de efluxo ativo expressos constitutivamente e a expressão de baixa quantidade de porinas de membrana externa de pequena abertura (VILA et al., 2007). A interação sinérgica entre esses traços inerentes reduz bastante a permeabilidade de antimicrobianos. A combinação de virulência intrínseca e múltiplos fatores de resistência faz de *A. baumannii* um paradigma de patogenicidade e com pouco ou nenhum composto candidato no desenvolvimento tardio para o tratamento de infecções por *Acinetobacter* MDR, simbolizando o fornecimento farmacêutico incompatível com a demanda clínica atual de novos antimicrobianos (PENDLETON; GORMAN; GILMORE, 2013).

2.3 Carbapenêmicos

A descoberta da penicilina em 1928 e a identificação subsequente de sua estrutura reativa contendo o anel β -lactâmico anunciaram talvez a classe de medicamentos mais bem-sucedida já descoberta. Décadas de investigação sobre este marco científico levaram à descoberta de mais de 100 antibióticos comercializados através de apenas alguns de modelos químicos (Figura 1) (SMITH et al., 2018). Quase 40 anos depois, o uso da penicilina foi ameaçado com o surgimento de beta-lactamases bacterianas, então começaram as buscas por inibidores dessas beta-lactamases (PAPP-WALLACE et al., 2011). Em meados da década de 70, os primeiros inibidores da beta-lactamases começaram a surgir, eram produtos naturais produzidos por bactérias gram-positivas agindo como beta-lactâmicos de amplo espectro, os ácidos oliváricos, porém devido à sua instabilidade química e pouca penetração celular, foram abandonados (LI et al., 2014). Pouco tempo depois, foram descobertos dois inibidores superiores da beta-lactamase, o ácido clavulânico, primeiro inibidor da β -lactamase clinicamente

disponível e a tienamicina, sendo esta última, a precursora dos carbapenêmicos (PAPP-WALLACE et al., 2011).

Figura 1 – Antimicrobianos beta-lactâmicos. Estruturas químicas dos beta-lactâmicos disponíveis clinicamente.



Fonte: Adaptado de Smith (2018)

Devido a sua instabilidade química a tienamicina estimulou a busca de derivados análogos com maior estabilidade. Devido à evolução contínua dos patógenos gram-negativos e gram-positivos resistentes à cefalosporina, previa-se que os compostos derivados da tienamicina tivessem um valor ainda maior com o tempo (PAPP-WALLAC et al., 2011). O imipenem foi o primeiro carbapenêmico utilizado no tratamento de infecções bacterianas, tendo sido derivado a partir da molécula de tienamicina. Posteriormente outros carbapenêmicos foram sendo desenvolvidos (NICOLAU, 2008). Ao longo da jornada para a descoberta de carbapenêmicos mais estáveis com um espectro mais amplo, outros compostos atualmente disponíveis, meropenem, biapenem, ertapenem e doripenem foram desenvolvidos. Um grande avanço nessa "jornada sintética" foi a adição de um grupo metil à posição 1-β. Vários carbapenêmicos foram identificados com essa modificação, muitos eram semelhantes aos carbapenêmicos atualmente disponíveis (PAPP-WALLACE et al., 2011). Geralmente, os carbapenêmicos são preferidos a outros tipos de antimicrobianos no tratamento de infecções invasivas ou com risco de vida devido ao

seu efeito de morte independente da concentração nas bactérias infectantes (WATKINS; BONOMO, 2013). Comparativamente, entre os carbapenêmicos, o doripenem é altamente estável contra a hidrólise da maioria das beta-lactamases, mas ao mesmo tempo é descrito como tendo concentrações inibitórias mínimas mais baixas (CIMs) em relação ao meropenem e imipenem para *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Evidências mostraram que o doripenem é menos suscetível e muito mais lento na hidrólise por carbapenemase que o imipenem. A eficácia do ertapenem contra *P. aeruginosa* é relativamente limitada quando comparada ao meropenem ou imipenem e em *A. baumannii* a suscetibilidade ao imipenem ou doripenem é maior em comparação com a do meropenem aumentou (BASSETTI; GINOCCHIO; MIKULSKA, 2011). *A. baumannii* se tornou resistente à maioria dos carbapenêmicos disponíveis clinicamente. Esse padrão angustiante representa uma grande ameaça à saúde pública. Mecanismos de resistência a carbapenêmicos incluem produção de beta-lactamases, bombas de efluxo e mutações que alteram a expressão e / ou função de porinas e PBPs. As combinações desses mecanismos causam altos níveis de resistência aos carbapenêmicos *A. baumannii* (PAPP-WALLACE et al., 2011).

2.4 Mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos

A identificação dos mecanismos de resistência encontrados em *A. baumannii* torna-se necessário para a otimização do resultado dos tratamentos. Ao modo que esse patógeno apresenta mecanismos de resistência complexos (ZHAO et al., 2015). As beta-lactamases são um importante mecanismo de resistência a antimicrobianos empregados por bactérias; essas enzimas periplásmicas hidrolisam antimicrobianos beta-lactâmicos, impedindo que o fármaco atinja a enzima PBP (proteína ligante de penicilina - *penicillin binding protein*). Atualmente, as beta-lactamases são classificadas em quatro classes distintas, com base em similaridades estruturais (classes A, B, C e D) ou em quatro grupos, com base nos perfis hidrolítico e inibidor. As beta-lactamases da classe B usam Zn^{2+} para inativar as beta-lactamases, e todas são carbapenemases. As β -lactamases das classes A, C e D usam uma serina como nucleófilo para hidrolisar a ligação beta-lactamases (BUSH K; JACOBY, 2010).

As carbapenemases da classe A são as mais comumente identificadas entre os isolados clínicos e existem em bactérias gram-positivas e gram-negativas. As carbapenemases do grupo A mostram perfis amplos de hidrólise do substrato, incluindo penicilinas, cefalosporinas e, para algumas enzimas, carbapenêmicos (RAHMAN et al., 2018). Além disso, existem outros tipos de carbapenemase tipo A, como KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), que devem ser motivo de grande preocupação, pois são amplamente disseminados e causam fenótipos de Beta-Lactamase de espectro estendido (ESBL). O KPC pode hidrolisar quase todas as carbapenemases, incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactamas e carbapenêmicos. No entanto, as enzimas do grupo A podem ser inibidas por inibidores da beta - lactamase, como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. Entre as carbapenemases classe A as enzimas KPCs são de grande preocupação, pois conferem resistência a todos os beta- lactâmicos e não são eficientemente inibidas pelos inibidores típicos da Classe A (MUNOZ et al., 2013)

As carbapenemases da classe B estão principalmente na classe de β -lactamases, que são suscetíveis à inibição pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), um quelante de Zn^{2+} e outros cátions divalentes (QUEENAN et al., 2007). O mecanismo de hidrólise depende da interação dos fármacos β -lactâmicos com íons de zinco no local ativo da enzima. As famílias de metalo- β -lactamase mais comuns incluem as metalo- β -lactamase de Nova Délhi 1 (NDM-1), carbapenemases do tipo *Pseudomonas* resistentes a imipenem (IMP), VIM (metalo- β -lactamase codificado por integração de Verona), GIM (Imipenemase alemão) e SIM (imipenemase de Seul). Os genes que codificam essas enzimas geralmente estão localizados em uma variedade de estruturas de integrons e incorporados aos cassetes de genes (CODJOE; DONKOR, 2017). Em meados de 2010, o gene NDM-1 pode ter sido adquirido por bactérias da comunidade e introduzido em outros países, incluindo Europa e Estados Unidos, por turistas que viajam ao redor do mundo, enquanto as mesmas cepas foram encontradas em amostras ambientais na Índia. Pelo menos 8 variantes foram descritas e identificadas neste grupo. Os genes NDM são dominantes nos isolados de *K. pneumoniae* e *Escherichia coli*, mas também foram encontrados em associação com os organismos *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (BEDENIĆ et al., 2014).

Atualmente, varias carbapenemases do tipo IMP foram identificadas. Este tipo foi reconhecido pela primeira vez na década de 1990 no Japão. A maioria dessas enzimas foi investigada nas espécies *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, bem como na família *Enterobacteriaceae*. Os genes IMP também foram encontrados no Brasil e no Canadá após os primeiros relatos da Europa em 1997. Esses tipos de genes se espalharam lentamente ao redor do mundo (QUEENAN et al., 2007; WALSH et al., 2011).

As carbapenemases da classe C ou comumente conhecidas como AmpC são cefalosporinases clinicamente importantes codificadas nos cromossomos de muitas *Enterobacteriaceae* e alguns outros organismos, onde medeiam a resistência à combinação de cefalotina, cefazolina, cefoxitina, maioria das penicilinas e inibidor de β -lactamase- β -lactama. Em muitas bactérias, as enzimas AmpC são indutíveis e podem ser expressas em altos níveis por mutação. A superexpressão confere resistência às cefalosporinas de amplo espectro, incluindo cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona (JACOBY, 2009). Os plasmídeos transmissíveis adquiriram genes para as enzimas AmpC, que conseqüentemente agora podem aparecer em bactérias que carecem ou que mal expressam um cromossomo gene *bla*.AmpC, como *E coli*, *K. pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Em *A. baumannii* são referidas como enzimas ADC (*Acinetobacter Cephalosporinases Derivative-Cefalosporinases Derivadas de Acinetobacter*) (WRIGHT et al., 2014). A resistência devido às enzimas AmpC mediadas por plasmídeo é menos comum que a produção de β -lactamase de espectro estendido na maior parte do mundo, mas pode ser mais difícil de detectar e mais amplo no espectro. As enzimas AmpC codificadas por genes cromossômicos e plasmídicos também estão evoluindo para hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro com mais eficiência (JACOBI, 2009).

As carbapenemases de classe D, também conhecidas como oxacilinases, são serina- β -lactamases pouco inibidas pelo EDTA ou pelo ácido clavulânico. Essas carbapenemases são do tipo OXA e têm uma atividade fraca contra os carbapenêmicos. As carbapenemases são encontradas majoritariamente em *Acinetobacter baumannii* e raramente em isolados da família *Enterobacteriaceae* (ANTUNES; FISHER, 2014). A OXA β -lactamase com atividade de carbapenemase foi descrita pela primeira vez por Paton e colaboradores (1993), e a enzima purificada de um *A. baumannii* multirresistente a fármacos isolados em 1985 de

um paciente em Edimburgo, na Escócia. A atividade das carbapenemases de OXA é aumentada por elementos a montante que controlam a expressão gênica. A principal preocupação com as carbapenemases de OXA é sua capacidade de sofrer mutações e expandir rapidamente seu espectro de atividade. Estudos de Mathers e colaboradores (2013) relataram a detecção frequente de classe D entre a família *Enterobacteriaceae*, tornando-a uma ameaça e um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Atualmente existem mais de 150 variantes descritas até o momento, onde 45 hidrolisam carbapenêmicos. As enzimas OXAs são geneticamente divididas em 6 subgrupos, amplamente encontradas em *A. baumannii* adquiridos por elementos genéticos móveis, os exemplos mais mencionados são *bla*OXA-23-like (OXA-23, OXA-27, and OXA-49), *bla*OXA-24-like (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, and OXA-72), *bla*OXA-58-like, *bla*OXA-143-like (OXA-143, OXA-231, and OXA-253), *bla*OXA-235, and *bla*OXA-51-like, este último subgrupo presente a nível cromossomal na espécie *A. baumannii* (NIGRO; HALL, 2016; KOBBS et al., 2016). A contribuição significativa das carbapenemases do tipo OXA em *A. baumannii* está associada a um aumento da expressão gênica, levando a uma resistência aos carbapenêmicos e tornando uma ameaça à saúde mundial (ALIRAMEZANI et al., 2016).

2.5 *Acinetobacter baumannii* produtora de carbapenemases

A primeira década do século XXI testemunhou um aumento na incidência de infecções devido a várias bactérias altamente resistentes a antimicrobianos em hospitais em todo o mundo. *A. baumannii* é um organismo que passou de um patógeno respiratório ocasional para um patógeno nosocomial importante (DOY; MURRAY; PELEG, 2015). O *A. baumannii* se tornou um dos patógenos mais bem-sucedidos nos cuidados de saúde modernos devido à sua incrível capacidade de adquirir resistência a antimicrobianos. Várias cepas de *A. baumannii* são altamente resistentes à maioria dos antibióticos disponíveis clinicamente (LIN; LAN, 2014). *A. baumannii* possui vários mecanismos de resistência, incluindo beta-lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, bombas de efluxo, defeitos de permeabilidade e modificações nos locais alvos. O acúmulo de vários mecanismos de resistência em *A. baumannii* diminuiu gradualmente o número de classes de antibióticos disponíveis para o tratamento de infecções por esse patógeno na prática clínica.

O mecanismo mais importante de resistência ao carbapenêmico em *A. baumannii* é a produção de carbapenemases, que podem ser intrínsecas ou adquiridas. *A. baumannii* produz naturalmente carbapenemase do grupo OXA-51 codificado por cromossomos em um nível baixo, e a aquisição de um promotor mais forte por transposição de uma sequência de inserção, análogo ao caso com ADC, a montante do gene do grupo OXA-51 pode levar a elevação de CIM a carbapenêmicos (TURTON et al, 2006). *A. baumannii* também se torna resistente a carbapenêmicos quando eles adquirem certos genes de beta-lactamase do grupo OXA em plasmídeos. Existem cinco grupos principais de carbapenemases adquiridas do grupo OXA em *A. baumannii*, entre eles, o grupo oxa-23 é o mais prevalente (MUGNIER et al., 2010). Recentemente, carbapenemases não pertencentes ao grupo OXA que se espalharam em *Enterobacteriaceae* também estão sendo adquiridas por *A. baumannii*. O mais preocupante dentre estes é o metalo- β -lactamase NDM-1. *A. baumannii* resistente ao carbapenêmico e produtora de NDM-1 foi identificada em todo o mundo desde 2011 (DECOUSSER et al., 2013) e outras metalo- β -lactamases adquiridas também foram relatadas em raras ocasiões. Finalmente, foi relatada em Porto Rico a carbapenemase produtora em *A. baumannii* que produz o grupo KPC, mas não há evidências de que ela tenha se espalhado para além desta ilha (ROBLEDO et al., 2010). O *A. baumannii* também parece ter uma resposta induzível a danos no DNA, na qual a proteína RecA desempenha um papel regulatório importante e parece adquirir resistências a antimicrobianos sob condições clinicamente relevantes de danos ao DNA, além disso, a RecA está envolvida na patogenicidade de *A. baumannii* (ARANDA et al., 2011; LEE et al., 2017).

2.6 Opções terapêuticas para infecções por *Acinetobacter baumannii* produtora de carbapenemases

Os carbapenêmicos têm sido geralmente considerados os agentes de escolha para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, devido à sua atividade intrínseca contra esse organismo e ao seu perfil de segurança favorável. No entanto, a suscetibilidade em declínio aos carbapenêmicos obrigou médicos e pesquisadores a explorar abordagens terapêuticas alternativas. Acrescenta-se o desafio de que quando *A. baumannii* adquire resistência aos carbapenêmicos, muitas vezes há

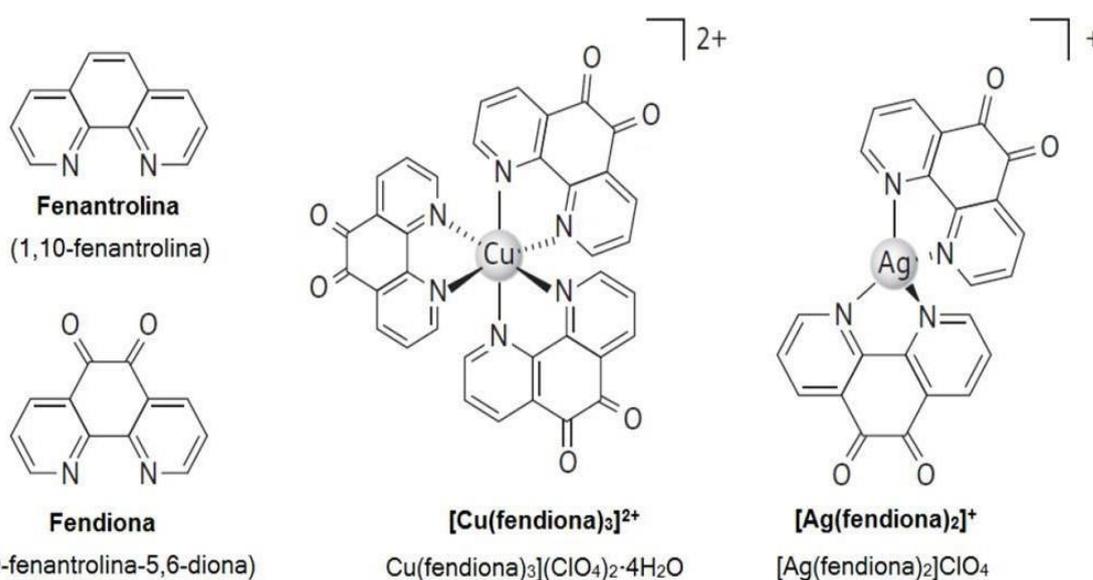
resistência a todos os outros antimicrobianos comumente usados (DOY; MURRAY; PELEG, 2015). Estudos recentes vêm mostrando estratégias terapêuticas utilizando a combinação de outras classes de antimicrobianos com carbapenêmicos que podem ser uma opção de tratamento viável para pacientes infectados com esses patógenos (WANG et al., 2019). Em um estudo com o objetivo de avaliar a atividade *in vitro* de diferentes combinações antimicrobianas (com e sem colistina) contra isolados clínicos de *A. baumannii*, incluindo combinações não convencionais, como COL + vancomicina (VAN) e COL + rifampicina (RIF) utilizando o teste de tempo-morte, foi mostrado uma atividade bactericida precoce e duradoura contra todas as cepas testadas, com ausência de crescimento às 24 h (OLIVA et al., 2019). A administração combinada de agentes antimicrobianos ganhou interesse porque muitas vezes leva a efeitos sinérgicos. A administração de combinações sinérgicas poderia ser uma maneira de superar problemas de toxicidade e desenvolvimento de resistência (UMERSKA et al., 2018). Apesar dos progressos importantes, a otimização farmacocinética / farmacodinâmica das dosagens e a duração do tratamento em pacientes críticos ainda tem algumas áreas de incerteza que requerem mais estudos, isso deve levar em conta também a seleção de resistência como um dos principais objetivos (BASSETTI et al., 2019). O tratamento de infecções graves por *A. baumannii* MDR em pacientes críticos no futuro próximo exigirá um raciocínio clínico especializado e complexo, obviamente levando em conta as características peculiares da população-alvo, mas também a necessidade de cobertura empírica adequada (BASSETTI et al., 2019). Consequentemente, o desenvolvimento de novos fármacos contra cepas de *A. baumannii* produtoras de carbapenemases é impreterível (TANGDEN et al., 2017).

2.7 1,10-fenantrolina e seus derivados

1,10-Fenantrolina (fenantrolina) é um dos ligantes quelantes *N,N*-heterocíclicos mais antigos e mais extensivamente estudados, e vários artigos publicados demonstraram que os fármacos à base de fenantrolina possuem propriedades antimicrobianas potente (MCCANN et al., 2012; SANTOS et al., 2012; VIGANOR et al., 2016), contra a uma grande diversidade de microrganismos patogênicos como *Trypanosoma cruzi* (SANTOS et al., 2012), *Leishmania* spp. (LIMA et al., 2009), *Plasmodium* e *Candida albicans* (DEVEREUX et al., 2000). Nas últimas décadas, esta molécula tem ganhado destaque por sua capacidade de formar

complexos estáveis com metais e outros ligantes, permitindo assim, a síntese de inúmeras moléculas bioativas (McCANN et al., 2012). Na busca de novos complexos mais efetivos e com menos efeitos colaterais McCANN e colaboradores (2004) sintetizaram, a partir da 1,10-fenantrolina, três novos compostos: 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendio), $[\text{Ag}(\text{fendio})_2]\text{ClO}_4$ (Ag-fendio) e $[\text{Cu}(\text{fendio})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Cu-fendio) (Figura 2). Estes compostos derivados da 1,10-fenantrolina alteraram o funcionamento de uma grande variedade de sistemas biológicos de tripanossomatídeos, fungos e bactérias, inclusive *P. aeruginosa* (McCANN et al., 2004; McCANN et al., 2012; SANTOS et al., 2012, SILVA, 2014). São capazes de perturbar seletivamente o metabolismo essencial do metal no microrganismo interferindo na aquisição de metais e biodisponibilidade para reações cruciais. Estudos mostraram que os derivados de 1- 10-fenantrolina são capazes de inibir o papel biológico de proteínas dependentes de metal (por exemplo, metaloproteases e fatores de transcrição), perturbando a homeostase das células microbianas e culminando no bloqueio da nutrição microbiana, crescimento e desenvolvimento, diferenciação celular, adesão ao biótico (por exemplo, componentes da matriz extracelular, célula e / ou tecido) e estruturas abióticas (por exemplo, plástico, silicone e acrílico), bem como controlar a progressão da infecção viral (SANTOS et al., 2012).

Figura 2 - Estrutura química da 1,10-fenantrolina e seus derivados: 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), Ag-fendiona e Cu-fendiona



Fonte: VIGANOR et al., 2016

McCANN e colaboradores (2012) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de compostos derivados da 1,10-fenantrolina em diferentes linhagens celulares de mamíferos e insetos bem como em testes *in vivo* utilizando-se larvas do inseto *Galleria mellonella* e camundongos suíços. Nos resultados *in vitro* realizados com diversas linhagens celulares, observou-se que os derivados metálicos Ag-fendiona e Cu-fendiona apresentaram menor IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50%) quando comparado a 1,10-fenantrolina e fendiona. Nos ensaios *in vivo*, usando-se larvas do inseto *G. mellonella*, 100% das larvas sobreviveram ao tratamento até a concentração de 33,3 mg/kg de 1,10-fenantrolina, fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona. Nos estudos que utilizaram o modelo murino, a sobrevivência foi de 100% em camundongos suíços tratados com até 150 mg/kg de 1,10-fenantrolina, fendiona, Ag-fendiona em até 72h, no entanto o tratamento com a mesma concentração (150 mg/kg) de Cu-fendiona foi letal a 60% dos camundongos em até 72h (McCANN et al., 2012).

Estudos realizados por VIGANOR e colaboradores (2016), demonstraram que a 1,10-fenantrolina e seus derivados (fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona) foram eficientes na inibição do crescimento planctônico de *P. aeruginosa* apresentando, respectivamente, CMI (concentração mínima inibitória) de 619,2, 33,6, 5,2 e 8,4 µM, assim como a formação do biofilme e a desarticulação do biofilme maduro.

3 JUSTIFICATIVA

Devido ao uso indiscriminado e à administração empírica, vários problemas de resistência microbiana aos antimicrobianos surgiram como um novo desafio para a terapêutica, tornando-se um grave problema de saúde pública mundial, causando elevados índices de mortalidade. Ao mesmo tempo, a redução no desenvolvimento de novos antimicrobianos limita as opções terapêuticas das infecções por bactérias multirresistentes. Dentre os grupos de microrganismos relacionados a infecções não tratáveis destacam-se cepas *A. baumannii*, um patógeno humano oportunista, responsável por infecções agudas e crônicas com significativa morbidade e mortalidade. Sua patogenicidade advém da plasticidade genética e metabólica, resistência a antimicrobianos intrínseca e adquirida. *A. baumannii* possui habilidade de sobreviver em superfícies secas e inanimadas além de elevada capacidade de disseminação cruzada por contato direto e indireto contribuindo para a sua disseminação no ambiente hospitalar. Com isso, a investigação de novas estratégias de tratamento, visando a potencialização da eficiência dos antibióticos tem estabelecido a associação antimicrobiana como uma alternativa direcionada às infecções causadas por bactérias resistentes. Este cenário evidencia a necessidade de descoberta e desenvolvimento de novas opções terapêuticas por meio de pesquisas da ação de produtos naturais e sintéticos que tenham atividade antimicrobiana contra *A. baumannii*. Neste contexto a 1,10-fenantrolina e seus derivados, fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona, representam um novo grupo promissor de agentes com atividades antimicrobianas e com grande potencial nesta nova proposta terapêutica para o tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* MDR produtoras de carbapenemases.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da 1,10-fenantrolina, 1,10-fenantrolina-5,6-dione (fendiona) $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$ (Ag-fendiona) e $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Cu-fendiona) em diferentes amostras clínicas de *A. baumannii* produtoras de carbapenemases.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o perfil de suscetibilidade das amostras clínicas aos principais antimicrobianos utilizados na terapêutica;

Determinar a concentração mínima inibitória para 1,10-fenantrolina e seus derivados;

Avaliar o possível efeito sinérgico entre fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona e carbapenêmicos *in vitro*;

Avaliar parâmetros farmacodinâmicos da ação da fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona sozinhos ou em associação com carbapenêmicos *in vitro*;

Avaliar parâmetros farmacodinâmicos da fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona sozinhos ou em combinação com carbapenêmicos em modelo de infecção em animal invertebrado;

Avaliar parâmetros farmacodinâmicos da fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona sozinhos ou em combinação com carbapenêmicos através de modelo de infecção peritoneal em camundongos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostras bacterianas

Foram incluídos neste estudo 26 amostras de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos proveniente de diferentes espécimes clínicos de pacientes atendidos em 10 hospitais da Grande Vitória no ano de 2014 apresentando carbapenemases do tipo OXA associada ao gene intrínseco *bla*OXA-51 (BROWN et al., 2005) (tabela 1). Essas amostras foram cedidas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo (LACEN-ES) e fazem parte do projeto de pesquisa 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.

Tabela 1. Distribuição dos genes das 26 amostras de *A. baumannii*

Genes pesquisados	Distribuição nas amostras
<i>bla</i> OXA-23/ <i>bla</i> OXA-51	24 (92, 3%)
<i>bla</i> OXA-24/ <i>bla</i> OXA-51	2 (7, 7%)

FONTE: Vallorini (2017)

As amostras foram obtidas a partir dos seguintes espécimes clínicos: aspirado traqueal (23,1% n=6), secreção traqueal (19,2% n=5), swab de ferida sacral (11,5% n=3), urina (7,7% n=2), fragmento de tecido ósseo (7,7% n=2), ponta de cateter (7,7% n=2), fragmento da região glútea (3,8% n=1), lavado bronco-alveolar (3,8% n=1), swab de cistotomia (3,8% n=1), swab de ferida do membro inferior esquerdo (3,8% n=1), swab nasal (3,8% n=1) e tecido abdominal (3,8% n=1).

Como requisito para controle de qualidade dos testes, utilizou-se as amostras *P.aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC 19606 (sensíveis aos carbapenêmicos). Além disso, uma amostra clínica de *P. aeruginosa* 09HC, isolada de sangue, com perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos e 1,10-fenantrolina e seus derivados previamente definidos por SILVA (2014) foi utilizada como cepa de referencia.

Todas as amostras bacterianas foram armazenadas em meio Triptone Soya Broth (TSB) com glicerol 20% e estocadas a -20°C.

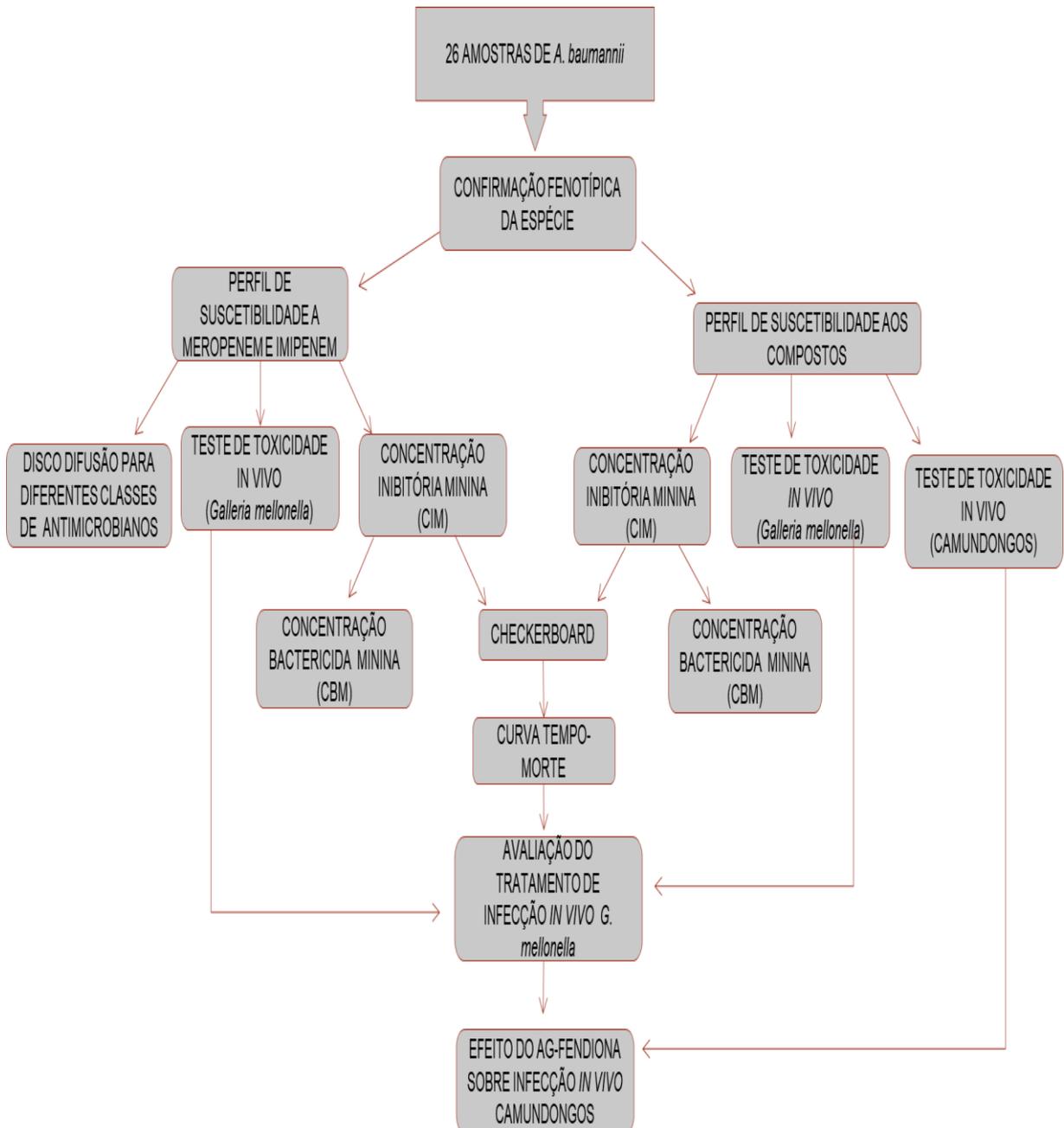
5.2 Compostos

Os compostos 1,10-fenantrolina, 1,10-fenantrolina-5,6-dione (fendiona), $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$ (Ag-fendiona) e $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Cu-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 a -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 1,10 fenantrolina, fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona sozinhos e em combinação aos carbapenêmicos Imipenem (IMP) e Meropenem (MPM), conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma dos experimentos realizados para a avaliação da atividade antimicrobiana de 1,10 fenantrolina e seus derivados de forma isolada e combinada a carbapenêmicos em 26 amostras de *A. baumannii*.



FONTE: O autor (2019)

5.4 Identificação fenotípica

Para confirmação da espécie *A. baumannii*, as amostras foram retiradas do estoque do banco de microrganismos (TSB com 20% de glicerol em a -20°C), semeadas em ágar MacConkey (Himedia®) e incubadas em aerobiose a 35 ± 2°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 Murray e colaboradores (2007) para a identificação primária de *A. baumannii*. Desta forma, foram realizados os testes de oxidase (Newprov®), motilidade em meio mili (Newprov®), oxidação-fermentação da glicose (OF) (Himedia®), fermentação de carboidratos e produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) em meio Triple Sugar Iron (TSI) (Himedia®), metabolização do citrato em meio Citrato de Simmons (Himedia®) e outras fontes de carbono, e crescimento em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Himedia®) a 42°C.

5.5 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

O perfil de suscetibilidade a oito antimicrobianos foi obtido segundo o método de difusão de disco de acordo com as instruções do protocolo do CLSI (2018) para os seguintes antimicrobianos: Imipenem (IMP) (10µg), Meropenem (MPM) (10µg), Gentamicina (GEN) (10µg), Ciprofloxacina (CIP) (5µg), Levofloxacina (LEV) (5µg), Tobramicina (TOB) (10µg), Amicacina (AMI) (30µg) e Trimetropim-sulfametoxazol (SUT) (1,3/23,75µg). Para realização do método foi preparada uma suspensão da amostra bacteriana em salina 0,9% com padrão de turvação similar ao da escala 0,5 de McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Com o auxílio de um *swab*, essa suspensão foi semeada em três direções por toda superfície de uma placa de ágar Mueller Hinton (MH). Os discos de antimicrobianos foram aplicados no máximo 15 minutos após a inoculação da placa. Em seguida, as placas foram incubadas a 35 ± 1°C por 16-20h e os diâmetros dos halos de inibição para cada antimicrobiano testado foram medidos com auxílio de uma régua. A categorização das amostras em sensível (S), resistente intermediária (RI) ou resistente (R) foi realizada segundo os limites de sensibilidade preconizados pelo CLSI (2018).

5.6 Método de disco combinado para detecção de *Metallo-beta-lactamase*

A fim de certificarmos que nossas amostras estavam produzindo ativamente as carbapenemases foi utilizado o teste de difusão em disco dos carbapenêmicos na presença ou ausência de EDTA. Para isso, uma solução de EDTA 0,5 M (Sigma-Aldrich) foi preparada dissolvendo 186,1 g de EDTA dissódico • 2H₂O em 1000 mL de água destilada e seu pH foi ajustado para 8,0 usando NaOH. A solução foi então esterilizada por autoclavagem. Suspensão da amostra bacteriana em salina 0,9% com padrão de turvação similar ao da escala 0,5 de McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foi inoculada sobre a superfície do ágar MH em placa de 15 x 150 mm. Em cada placa foram adicionados discos de 10 µg de MPM, com e sem 5 µL de solução de EDTA 0,5M. Como o EDTA tem alguma atividade antimicrobiana utilizou-se um disco de papel de filtro com 5 µL de solução de EDTA 0,5M como controle. O procedimento foi repetido três vezes para garantir a reprodutibilidade dos resultados. As zonas de inibição de crescimento bacteriano do disco foram comparadas após 16-18h de incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Um aumento no tamanho da zona de inibição de pelo menos 7 mm em torno do disco MPM-EDTA em comparação com o disco MPM sem EDTA foi considerado como cepa produtora de carbapenemase (FIGUEIREDO et al., 2009; VIGANOR et al., 2016).

5.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo dos carbapenêmicos

A determinação da CIM para MPM (Sigma-Aldrich®) e IPM (Sigma-Aldrich®) foi avaliada pelo método de microdiluição de acordo com CLSI (2018), utilizando-se placa de microtitulação de 96 poços com caldo Mueller Hinton cátion ajustado (MHB-ca) (BD Difco™) contendo diferentes concentrações dos carbapenêmicos. Para realização do método, a suspensão bacteriana foi preparada a partir de cultura pura das amostras em ágar sangue (AS) 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 ao padrão 0,5 da escala de McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Essa suspensão foi diluída para a obtenção de um inóculo final de 10^5 UFC/mL em cada poço e foi inoculada na placa combinado ao caldo MHB-ca e o MPM em diluições seriadas variando de 1 a 64 µg/mL, e com MHB-ca e o IPM em diluições seriadas

variando de 2 a 128 µg/mL. A placa foi incubada por 18-24h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A leitura foi realizada através da inspeção visual do crescimento bacteriano. A menor concentração que não apresentou crescimento visível foi considerada como a CIM. A categorização das amostras em sensível (S), resistente intermediário (RI) ou resistente (R) foi realizada segundo os limites de sensibilidade preconizados pelo CLSI (2018). Assim, valores de CIM foram considerados na faixa de resistência quando ≥ 8 µg/mL, intermediários quando iguais a 4 µg/mL e na faixa de sensibilidade quando ≤ 2 µg/mL.

5.8 Efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre o crescimento das amostras de *A. baumannii*.

5.8.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM dos compostos 1,10-fenantrolina, 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 MHB-ca (BD Difco™) contendo diferentes concentrações dos compostos na faixa de 1,56 a 100 µg/mL (partindo de uma solução 100 mM em DMSO). A suspensão bacteriana foi preparada a partir de cultura pura das amostras em ágar sangue 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 ao 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 conforme descrita para os compostos. A determinação da CIM dos compostos e dos sais foi realizada em triplicata.

5.8.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A CBM dos compostos 1,10-fenantrolina, fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona foi determinada a partir do experimento de determinação da CIM descrita no item anterior (5.8.1). Para isso, uma alíquota de 10 μ L foi coletada de cada poço até quatro diluições a partir da CIM e, em seguida, inoculada na superfície de placas contendo MHA. As placas foram inspecionadas para a presença de colônias de *A. baumannii* 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).

5.8.3 Curva dose-resposta

Para avaliar a atividade e a farmacodinâmica de Cu-fendiona e Ag-fendiona, curvas dose-resposta foram geradas aplicando-se concentrações de $\frac{1}{4}$, 1, 4 e 16 x CIM destes compostos a amostras selecionadas de *A. baumannii*. O teste foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços contendo as concentrações-alvo dos compostos diluídos em MHB-ca, inoculada com suspensão bacteriana obtida seguindo os mesmos procedimentos realizados no método de microdiluição em caldo descrito anteriormente (5.8.1). A microplaca foi incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e após 0, 3, 6, 9, 12 e 24h foi procedida a leitura da densidade ótica de cada poço e a retirada de alíquotas de 10 μ L para plaqueamento em ágar nutriente através da técnica de microgota. As placas foram então incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-24h e, após esse período, realizou-se contagem das UFCs. As curvas foram plotadas com dados de UFC/mL em função do tempo, apresentando-se uma curva distinta para cada concentração do composto.

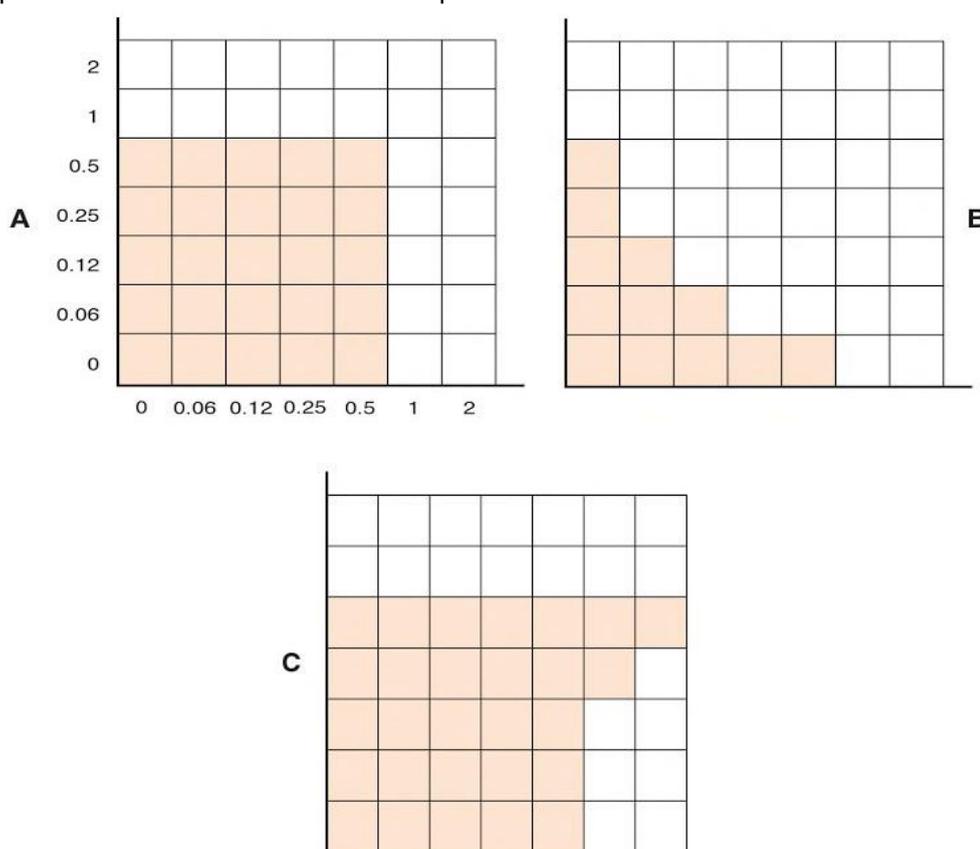
5.9 Efeitos de fendiona e seus derivados combinados a carbapenêmicos sobre o crescimento das amostras de *A. baumannii*

5.9.1 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 / fendiona, MPM / Cu-fendiona, MPM / Ag-fendiona, IMP / fendiona, IMP /

Cu-fendiona e IMP / 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 $1/4 \times \text{CIM}$ a $4 \times \text{CIM}$, foi disposto em colunas e o antimicrobiano, nas concentrações de $1/8 \times \text{CIM}$ a $4 \times \text{CIM}$, disposto em linhas, de forma a combinarem entre si (Figura 4). As diluições dos compostos e dos antimicrobianos foram preparadas em caldo MHB-ca.

Figura 4 – Representação esquemática dos possíveis resultados apresentados por combinações de dois compostos com atividade antimicrobiana pelo método de *checkerboard*



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 $\text{ICIF} \leq 0,5$; aditividade foi definida como $\text{ICIF} > 0,5$ a $< 2,0$; indiferença foi definida como $\text{ICIF} \geq 2,0$ a < 4 e antagonismo foi definido como $\text{ICIF} \geq 4,0$ (PILLAI; MOLLERING; ELIOPOULOS, 2005).

5.9.2 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. As concentrações avaliadas foram obtidas a partir dos resultados do *Checkerboard*. 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 preparada 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 24 h 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 $2 \log_{10}$ na contagem de UFC/mL das amostras sob ação da combinação antimicrobiana, quando comparada com seu constituinte mais ativo em um tempo determinado. As atividades bacteriostática e bactericida foram definidas quando houve reduções de $< 3 \log_{10}$ e $\geq 3 \log_{10}$ na contagem de UFC/mL das amostras, respectivamente, sob ação da combinação antimicrobiana, quando comparada com seu constituinte mais ativo em um tempo determinado (CLSI, 1999).

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

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

Todas as larvas utilizadas foram criadas e mantidas no Laboratório de Resistência Bacteriana (RESBAC) da 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).

5.10.2 Teste de toxicidade *in vivo* de fendiona e seus derivados e do MPM

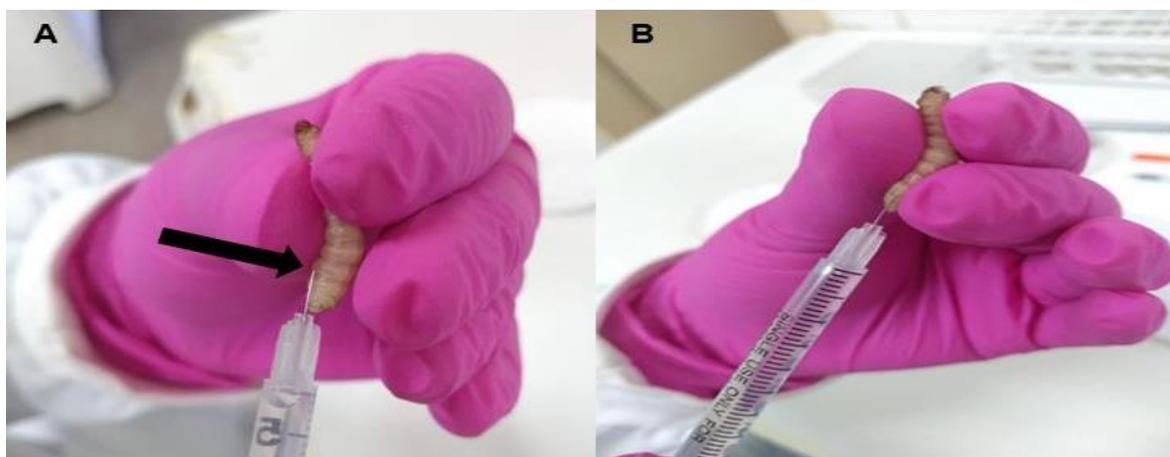
Os compostos fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona, bem como o antimicrobiano MPM foram testados nas larvas de *G. mellonella*, de acordo com a metodologia descrita por VIGANOR e colaboradores (2014), para verificar o nível de toxicidade provocada neste modelo animal. Para isso foram injetados, através de seringa de insulina diretamente na hemocele 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 35 ± 2°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.

5.10.3 Infecção e índice de sobrevivência

Para avaliar a infecção e o índice de sobrevivência nas larvas de *G. mellonella*, 10 µL de inóculo de *A. baumannii* em três concentrações distintas (10^8 , 10^7 e 10^6 UFC/mL) foram injetados diretamente na hemocele das larvas através de uma abertura na base do último par de pseudo-pés, utilizando seringa de insulina (Uniqmed®) de acordo com o protocolo descrito por Ramarao e colaboradores (2012) (Figura 5). A solução de inóculo foi obtida por meio da seleção de três a cinco

colônias de mesmo tipo morfológico a partir da cultura em AS, as quais foram tocadas com alça estéril e, em seguida, transferidas para um tubo contendo caldo LB. Em seguida as amostras foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 h para que atingissem a fase exponencial de crescimento, tempo previamente determinado por curva de crescimento das amostras. Após a incubação, 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. 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 5 – 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)

Em seguida, as larvas foram dispostas em placas de Petri contendo discos de papel Whatman e, então, incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 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. Os controles negativos dos experimentos consistiram em 10 larvas não inoculadas e 20 larvas inoculadas com 10 μL de solução PBS estéril.

5.10.4 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 5.10.3. Após 30 min, tratamento antimicrobiano ou PBS (controle) foram administrados às larvas infectadas. Os tratamentos consistiram em doses subinibitórias de Ag-fendiona, Cu-fendiona e MPM, sozinhos e combinados entre si, diluídos em PBS. Um segundo controle foi empregado e consistiu de um 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 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 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.

5.11 Efeitos do Ag-fendiona em modelo de infecção peritoneal em camundongos

5.11.1 Aspectos éticos e animais

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFES conforme o registro número 04/2017.

Para os testes foram utilizados camundongos machos Swiss (*Mus musculus*) de 4-6 semanas (peso $30 \text{ g} \pm 5$) obtidos do Biotério do Centro de CCS/UFES e mantidos no Laboratório de Experimentação *in vivo*. Os animais foram mantidos em gaiolas com iluminação controlada (12 h claro / escuro - ciclos), temperatura de 25°C , com livre acesso à água e ração comercial (Purina, Paulina, SP, Brasil). Os experimentos foram realizados no RESBAC.

5.11.2 Determinação da DL₅₀ e sobrevivência

A determinação da DL₅₀ e do índice de sobrevivência foram realizados de acordo com Cirioni e colaboradores (2016) pela injeção de 0,2 mL de suspensão de *A. baumannii* em camundongos via intraperitoneal, com inóculos variando de 10⁶ a 10⁸ UFC/mL para provocar infecções sub-letais e letais, respectivamente enquanto o grupo controle receberam PBS. A solução do inóculo foi obtida como descrito no item 5.10.3. As observações quanto ao padrão fisiológico e comportamental ocorreram no período de 96h de modo que todos os animais que apresentassem características de dor e sofrimento foram eutanasiados.

Figura 6 – Inoculação em camundongos



A: Inoculação do inóculo via i.p.; **B:** Inoculação do composto via i.p.

FONTE: O autor (2018)

5.11.3 Teste de toxicidade aguda em camundongos

O composto Ag-fendiona foi testado em camundongos Swiss, de acordo com a metodologia descrita por MCCANN e colaboradores (2012), para verificar o nível de toxicidade aguda neste modelo animal. Para isso, foram injetados 0,1 mL do composto em concentrações variando de 1,56 a 150 mg/Kg administrados por via intraperitoneal. O grupo controle recebeu PBS estéril e um grupo de animais recebeu injeções contendo DMSO a 10% (concentração de DMSO usado para diluir os compostos). Após as injeções, os animais foram observados durante as primeiras 8 horas e depois a cada 12 horas, até um total de 120 horas (5 dias).

5.11.4 Desenho experimental

A fim de avaliar os efeitos do Ag-fendiona sobre um processo de infecção já estabelecido, os animais foram desafiados com *A. baumannii* e submetidos ao tratamento curativo com o composto.

Os animais foram separados em 4 grupos com 5 indivíduos cada. Todos os grupos experimentais receberam uma suspensão contendo 10^7 UFC/mL de *A. baumannii* por via intraperitoneal (i.p). Após 2 h de infecção, os grupos receberam 1,56, 6,25, 25 e 75 mg/kg de Ag-fendiona via i.p. Após 8 h de infecção foram submetidos aos procedimentos de eutanásia para realização das análises.

Para avaliação da influência do tratamento de Ag-fendiona sobre o aumento da sobrevivência dos animais infectados, quatro grupos com 5 indivíduos cada receberam uma suspensão contendo 10^7 UFC/mL de *A. baumannii* por via intraperitoneal (i.p). Os mesmos tratamentos foram realizados e os camundongos foram avaliados quanto aos sintomas clínicos e de sobrevivência após a infecção e foram monitorados a cada 12 horas por um período até 96h.

5.11.5 Determinação da carga bacteriana

Para esta análise, os testes foram conduzidos segundo Oliveira et al (2012) e assim, o baço e o fígado dos animais foram removidos assepticamente e homogeneizados em PBS pH 7,2. O sangue e o fluido peritoneal obtidos foram diluídos também em PBS. As suspensões destes órgãos e amostras de sangue e fluido peritoneal foram submetidas a diluições decimais seriadas e uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi plaqueada em Ágar MacConkey. As placas foram incubadas 18-24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para posterior quantificação de UFC. Os resultados foram expressos em Log UFC/mL de fluido ou Log UFC/g de órgão.

5.11.6 Contagem total e diferencial de leucócitos

A contagem total de leucócitos no sangue e fluido peritoneal foi realizada de acordo com Souza e Ferreira (1985) com algumas adaptações. Assim, 20 μL da amostra foram homogeneizadas com 380 μL do reagente de Turk (Newprov®). Uma alíquota desta solução foi retirada e colocada numa câmara de Neubauer (Olen®), e os leucócitos foram contados sob um microscópio óptico Zeiss®. A contagem diferencial foi feita a partir de esfregaços corados com Panótico Rápido (Newprov®).

Posteriormente, foi realizada a contagem de linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos também em microscópio óptico. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão médio de células $\times 10^3$ células/mm³ de sangue.

5.12 Efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre a formação do biofilme

5.12.1 Produção de Biofilme por cepas de *A. baumannii*

A produção do biofilme foi avaliada segundo Silva (2014) e Croes e colaboradores (2009) com modificações. Suspensões de amostras bacterianas correspondentes a 0,5 de turbidez da escala McFarland (10^8 UFC/mL) foram realizadas em caldo LB. Depois foram distribuídos 100 μ L de cada suspensão numa placa de poliestireno de 96 poços, que foram incubadas por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Para a quantificação do biofilme bacteriano, os poços contendo as células aderidas foram lavados 3 vezes com 200 μ L de salina. Depois, adicionou-se 100 μ L de cristal violeta (0,3%) aos poços e após 15 min os poços foram lavados com água corrente para retirar o excesso do mesmo. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de álcool etílico a 70% adicionado de 10% álcool isopropílico, com a finalidade de retirar o cristal violeta do interior das células. Por fim, a quantidade de cristal violeta foi mensurada em espectrofotômetro Thermomax Molecular Device a 590 nm. O biofilme foi classificado de acordo com a comparação entre a leitura de absorvância do biofilme e a leitura de absorvância do controle negativo (caldo MHB-ca sem o inóculo bacteriano), como previamente proposto por STEPANOVIC e colaboradores (2000). Desta forma, quando a absorvância do biofilme foi inferior à absorvância do controle negativo, o biofilme foi considerado não aderente ($\text{Abs biofilme} \leq \text{Abs controle negativo}$); quando a absorvância do biofilme foi maior em até duas vezes a absorvância do controle negativo, o biofilme foi considerado pouco aderente ($\text{Abs biofilme} \leq 2 \times \text{Abs controle negativo}$); quando a absorvância do biofilme formado foi entre 2 a 4 vezes da absorvância do controle negativo, o biofilme foi considerado de aderência moderada ($2 \times \text{Abs controle negativo} < \text{Abs biofilme} \leq 4 \times \text{Abs controle negativo}$) e quando a absorvância do biofilme foi superior a 4 vezes à absorvância do controle negativo, o biofilme foi considerado muito aderente ($\text{Abs biofilme} > 4 \times \text{Abs controle negativo}$).

5.12.2 Avaliação da ação 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre a formação do biofilme

Para este ensaio, as amostras foram semeadas em ágar nutriente e incubadas por 24h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, as células foram repicadas em caldo LB e incubadas por 24h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram preparadas suspensões de amostras bacterianas em caldo LB com turvação correspondente ao padrão 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Depois foram distribuídos 100 μL de cada suspensão numa placa de poliestireno de 96 poços, que foram incubadas por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ na ausência ou na presença da 1,10-fenantrolina e seus derivados a uma concentração de $0,5 \times \text{MIC}$. Em seguida, os sobrenadantes foram recolhidos e os poços foram lavados três vezes com 200 μL de solução salina. Para avaliar a biomassa do biofilme, adicionou-se 100 μL de solução de cristal violeta (0,3% p/v) aos poços e após 15 min os poços foram lavados com água corrente para retirada do excesso do corante. Finalmente, após secagem das placas, o cristal violeta adsorvido no biofilme foi diluído por adição de 100 μL de etanol a 70% com álcool isopropílico a 10%. A absorbância foi medida espectrofotometricamente utilizando um leitor de microplacas Thermomax Molecular Device a 540 nm (VIGANOR et al., 2016; Qi et al., 2016).

5.12.3 Avaliação da ação 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre a viabilidade metabólica das cepas de *A. baumannii* em biofilme

Além da quantidade de biofilme formado, também foi quantificada a atividade metabólica das cepas de *A. baumannii* após o tratamento com 1,10-fenantrolina e seus derivados. Para isso foi feito um ensaio colorimétrico que quantitativamente mede a redução metabólica de hidróxido de 2,3-bis (2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[fenilamina)carbonil]-2H-tetrazólio (XTT) para um produto de formazano castanho solúvel em água. Neste sentido, 100 μL da solução de XTT / menadiona [4mg de XTT foram dissolvidos em 10 mL de PBS pré-aquecido (NaCl 0,15M / tampão fosfato 0,01, pH 7,2) e suplementados com 100 mL de solução-mãe de menadiona, a qual continha 55 mg de menadiona em 100 mL de acetona] foi adicionado a todos os poços e incubou-se no escuro a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 h. O conteúdo dos poços foram transferidos para tubos de microcentrifuga e centrifugados a 4000g durante 5 min.

Um total de 100 μL de sobrenadante de cada poço foi transferido para uma nova placa de microtitulação e o valor de absorvância foi medido a 490 nm utilizando um leitor de microplacas (VIGANOR et al., 2016, Qi et al., 2016).

5.13 Efeito da 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre desarticulação do biofilme maduro

As suspensões bacterianas foram preparadas em meio LB a 10^8 UFC/mL. Em seguida, adicionou-se 100 μL da suspensão a cada poço numa placa de poliestireno de 96 poços, que foram incubadas por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o tempo de formação do biofilme (24 h), a 1,10-fenantrolina e seus derivados foram adicionados em concentrações variando de 1,56 a 25 mg/L e incubados durante mais 24h. Ao fim do período de incubação, procedeu-se à coloração com cristal violeta e XTT e posterior quantificação como descrito anteriormente. O controle compreendeu as células bacterianas no meio de cultura LB e PBS.

5.14 Estatísticas e correlações

Para a avaliação da atividade antimicrobiana de 1,10-fenantrolina 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 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: 1,10-fenantrolina = 198,23, 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 os demais testes os dados obtidos foram expressos como a média \pm desvio padrão. Para comparação múltipla dos dados não paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com grau de significância estatística de 95% ($p < 0,05$), seguida do teste de Bonferroni ou Student Newman-

Keuls. 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 os programas utilizados para geração dos dados foi o *GraphPad Prism7* e o *Sigma Plot 14.0*.

6 RESULTADOS

6.1 Identificação fenotípica

Todas as 26 amostras incluídas neste estudo apresentaram resultados compatíveis com a espécie *A. baumannii*: cocobacilos gram negativos após interpretação da morfologia pela coloração de gram; crescimento em ágar MacConkey apresentando colônias planas, por vezes mucoides e coloração branco-acinzentada (lactose negativa); reação negativa nos testes de motilidade e indol; oxidase negativa; catalase positiva; resultado positivo para metabolização do citrato; resultado negativo para o teste OF de fermentação de glicose (metabolismo oxidativo); não fermentação de nenhum açúcar em meio TSI e crescimento positivo em caldo BHI a 42 °C.

6.2 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

O teste de difusão de disco foi realizado para verificar os perfis de suscetibilidade a 8 antimicrobianos. Os resultados mostraram que todas as cepas de *A. baumannii* foram resistentes à ciprofloxacina e à levofloxacina, ambas pertencentes à classe das quinolonas. As taxas de resistência para outros antimicrobianos foram: 76,9% (20/26 amostras) à gentamicina, 73,1% (19/26 amostras) à tobramicina, 50% (13/26 amostras) à amicacina e 80,9% (21/26 amostras) à trimetropim- sulfametoxazol. Além disso, 80,7% (21/26 amostras) das cepas foram resistentes a pelo menos 3 classes de antimicrobianos, sendo classificadas como MDR e 7,7% (2/26 amostras) das cepas foram resistentes a todos os antimicrobianos testados, sendo consideradas resistentes a todas as classes de antimicrobianos indicados para a espécie (cepas PDR - “pandrug resistant”).

6.3 Detecção de MBL

Este método foi usado para a verificação da produção ativa de carbapenemase. Todas as amostras de *A. baumannii* foram testadas quanto à produção de MBL para verificação da produção ativa de carbapenemases. A combinação de disco meropenem / EDTA indicou produção de MBL em 25 (96,15%) cepas.

6.4 Determinação da CIM dos Carbapenêmicos

Todas as amostras de *A. baumannii* apresentaram CIM acima de 8 µg/mL (ponto de corte para resistência segundo CLSI 2018) e portanto, foram consideradas resistentes aos carbapenêmicos. Para MPM, as CIM variaram de 16 µg/L a 64 µg/L, enquanto que para IMP, as CIM variaram de 32 µg/L a 128 µg/L (Tabela 2).

6.5 Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre o crescimento das amostras de *A. baumannii*

6.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As 26 amostras foram avaliadas em relação aos efeitos inibitórios de 1,10-fenantrolina e seus derivados. 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 1,10-fenantrolina, fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona. Com o intuito de confirmar se o efeito observado foi decorrente da ação dos complexos, e não dos íons Ag^+ e Cu^{2+} , a atividade antibacteriana do sal de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e do sal de prata (AgNO_3) também foi avaliada. Na tabela 2 podemos observar que tanto Cu-fendiona (GM-CIM 1,63 µM) quanto Ag-fendiona (GM-CIM 2,48 µM), foram mais eficientes na inibição do crescimento bacteriano, seguido por fendiona (GM-CIM 9,44 µM) e 1,10-fenantrolina (GM-CIM 70,46 µM). Entre os sais, AgNO_3 apresentou moderada atividade antimicrobiana sobre *A. baumannii* (GM-CIM 39,6 µM), o sal de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ foi essencialmente inativo até a concentração de 200 mg/L (GM-CIM > 801 µM). O DMSO aquoso, que foi utilizado como solvente para todos os compostos não interferiu nos resultados.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) dos carbapenêmicos e compostos nos isolados clínicos *A. baumannii*

Compostos	Varição da CIM ($\mu\text{g/ml}$)	CIM ₅₀ em $\mu\text{g/ml}$	CIM ₉₀ em $\mu\text{g/ml}$	MG-CIM em $\mu\text{g/ml}$ (μM)
Meropenem	16 – 64	32	64	44,42 (ND)
Imipenem	32 – 128	64	128	61,54 (ND)
1,10-fenantrolina	12,5 – 25	12,5	12,5	12,98 (70,46)
Fendiona	1,56 – 6,25	1,56	1,56	1,98 (9,44)
Ag-fendiona	1,56	1,56	1,56	1,56 (2,48)
Cu-fendiona	1,56	1,56	1,56	1,56 (1,63)
AgNO ₃	6,25-12,5	6,25	6,25	6,73 (39,61)
CuSO ₄ .5H ₂ O	>200	>200	>200	>200 (>801)

MG-CIM, média geométrica da CIM;

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

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

FONTE: O autor (2019)

6.5.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

As 26 amostras foram avaliadas em relação aos efeitos bactericidas dos compostos em estudo. Foi verificada atividade bactericida para os quatro compostos estudados, com valores de CBM variando de 12,25 a 50 $\mu\text{g/mL}$ para 1,10-fenantrolina, de 1,56 a 3,12 $\mu\text{g/mL}$ para fendiona e de 1,56 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ para Ag-fendiona e Cu-fendiona. Na tabela 3 podemos observar que Cu-fendiona apresentou o menor valor de MG-CBM (2,30 μM), seguido de Ag-fendiona (3,63 μM), fendiona (9,70 μM) e, por último, 1,10-fenantrolina (184,28 μM).

Tabela 3. Valores de CBM e MG-CIM de 1,10-fenantrolina e seus derivados no crescimento das amostras de *A. baumannii*

Compostos	CBM ₅₀ em $\mu\text{g/ml}$	CBM ₉₀ em $\mu\text{g/ml}$	MG-CBM em $\mu\text{g/ml}$ (μM)	MG-CIM em $\mu\text{g/ml}$ (μM)
1,10-fenantrolina	50	50	36,53 (184,28)	12,98 (70,46)
Fendiona	1,56	3,12	2,04 (9,70)	1,98 (9,44)
Ag-fendiona	1,56	3,12	2,28 (3,63)	1,56 (2,48)
Cu-fendiona	1,56	3,12	2,22 (2,30)	1,56 (1,63)

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

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

MG-CBM, média geométrica do CBM.

MG-CIM, média geométrica do CIM.

FONTE: O autor (2019)

6.5.3 Curva de dose-resposta

Por meio desse método foram observadas algumas características farmacodinâmicas como confirmação da ação bactericida; tempo máximo de ação bactericida e ação bactericida dose-dependente dos compostos Cu-fendiona e Ag-fendiona sobre as amostras clínicas: 30B, 38B, 98B e 101B, que apresentaram valores de CIM para MPM distantes entre si (16 µg/mL a 64 µg/mL), em relação à concentração x tempo. Os compostos foram avaliados nas concentrações de $\frac{1}{4}$ x CIM, 1 x CIM, 4 x CIM e 16 x CIM. Observamos uma maior ação bactericida para Cu-fendiona entre 6 a 9 h com redução acima de 3 log₁₀ na concentração 1 x CIM para o crescimento bacteriano, o mesmo foi observado em relação a 4 x CIM. Na concentração 16 x CIM foi observado uma redução maior, de até 6 logs no mesmo período (figura 7 A, B, C e D). O Ag-fendiona apresentou comportamento semelhante ao Cu-fendiona havendo uma redução de no mínimo 3 log₁₀ entre 6 a 9 h nas concentrações de 1 x e 4 x CIM. Na concentração 16 x CIM o Ag-fendiona apresentou uma redução acima de 5 log₁₀ entre 6 a 9 h e para três amostras houve uma erradicação do crescimento bacteriano (figura 8 A, B C e D).

Não foi observada ação bactericida dose-dependente para ambos os compostos. A redução do crescimento bacteriano entre as concentrações 1 e 4 x CIM foi de no máximo a 1 log₁₀, Somente foi observado uma maior redução do crescimento bacteriano na concentração de 16 x CIM em relação a 4 x CIM de 2 a 3 log₁₀ para Cu-fendiona e Ag-fendiona entre 6 e 9h.

Figura 7 – Curva dose-resposta de amostras clínicas de *A. baumannii* tratadas com as concentrações $\frac{1}{4}$ x CIM, 1 x CIM, 4 x CIM e 16 x CIM do Cu-fendiona

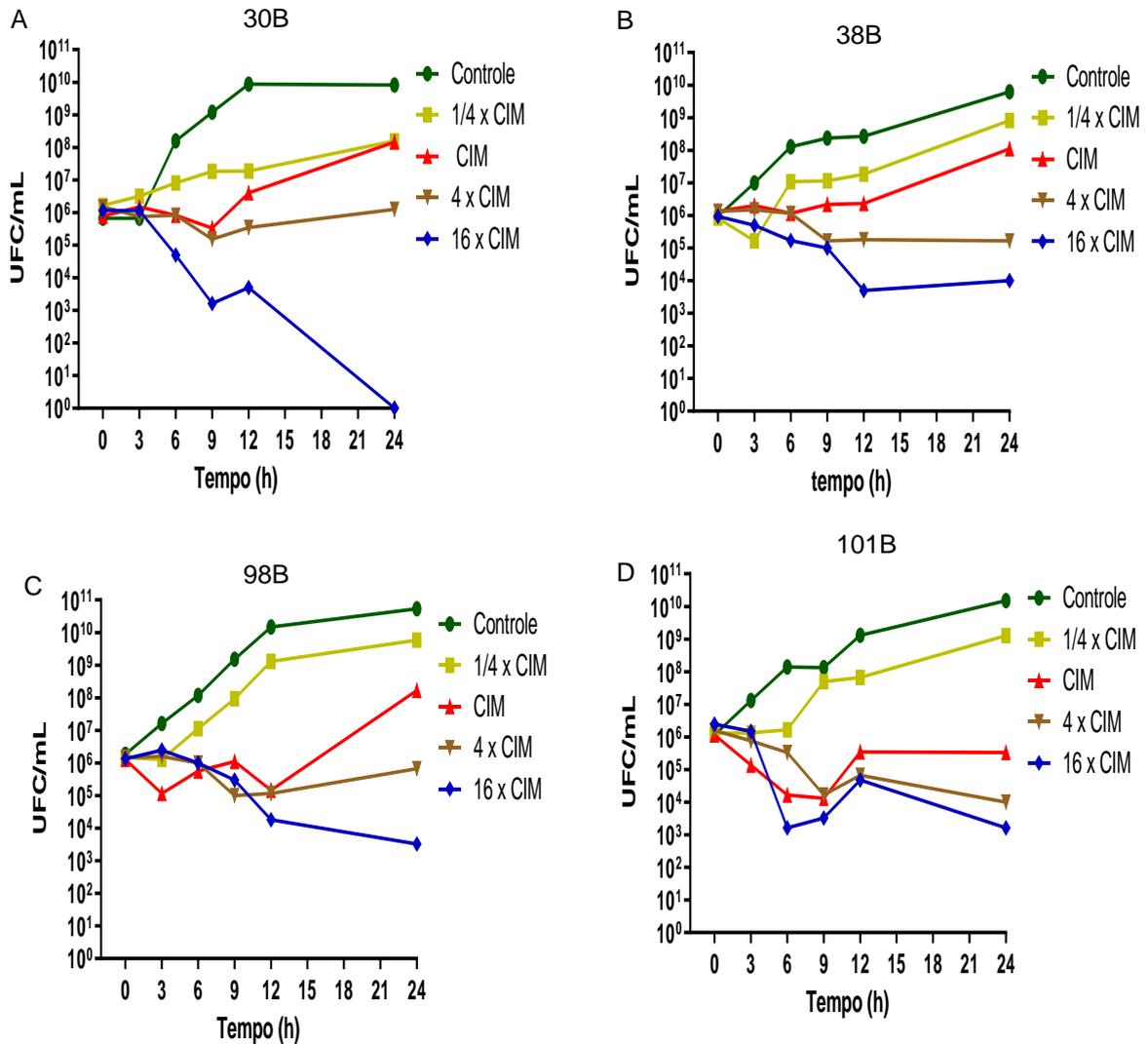


Figura 7 - Curva dose-resposta das amostras clínicas de *A. baumannii* 30B (A), 38B (B), 98B (C) e 101B (D)

FONTE: O autor (2019)

Figura 8 – Curva dose-resposta das amostras clínicas de *A. baumannii* tratadas com as concentrações $\frac{1}{4}$ x CIM, 1 x CIM, 4 x CIM e 16 x CIM do Ag-fendiona

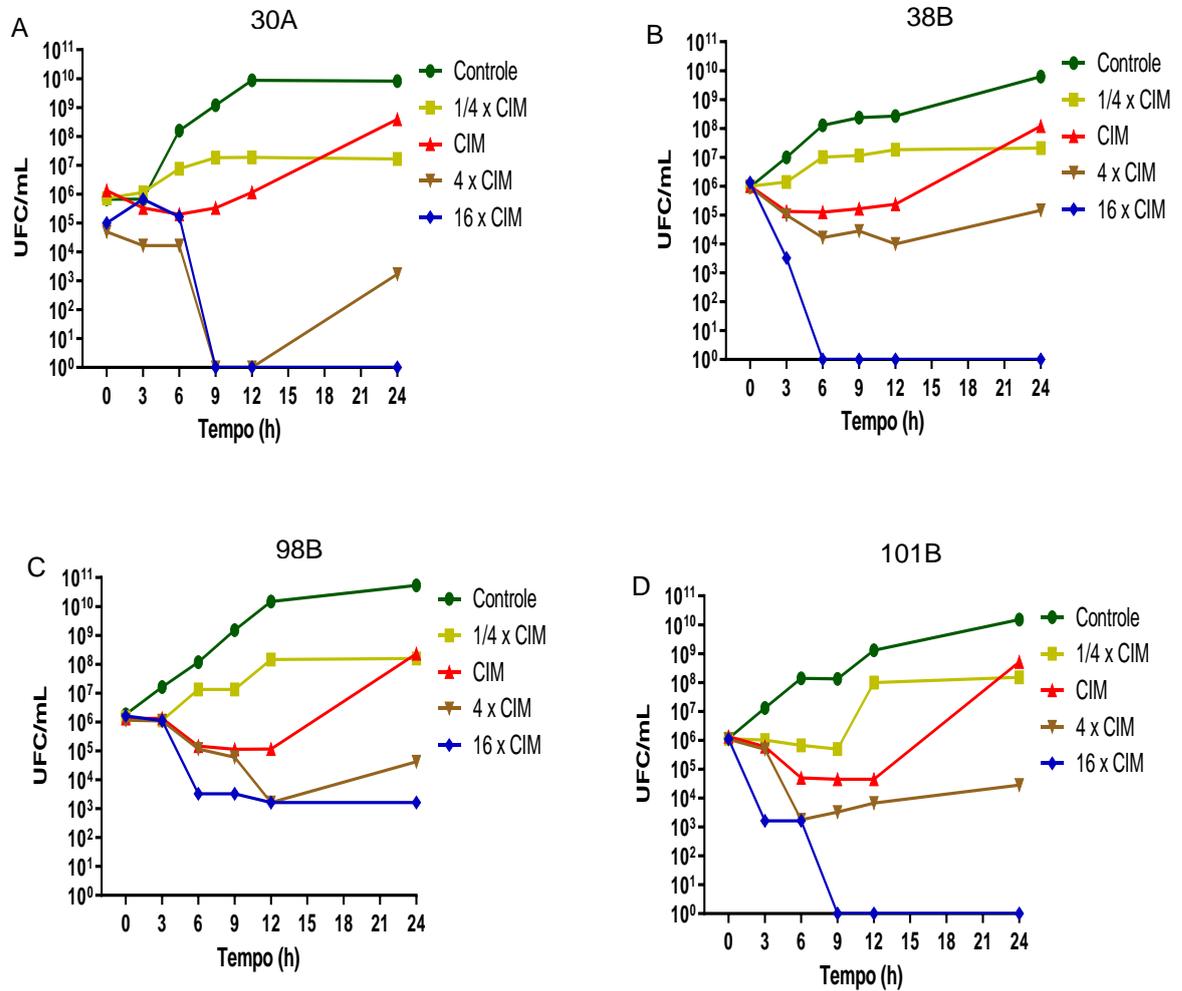


Figura 8 – Curva dose-resposta das amostras clínicas de *A. baumannii* 30B (A), 38B (B), 98B (C) e 101B (D)

FONTE: O autor (2019)

6.6 Efeitos fendiona e seus derivados sozinhos ou em combinação a carbapenêmicos

6.6.1 Método *Checkerboard*

Para o método *Checkerboard* foram selecionadas 11 amostras de *A. baumannii* com genótipos distintos determinados pela técnica de polimorfismo de fragmentação do DNA por enzima de restrição (PFGE) realizada por Vallorini (2017). Os critérios de avaliação utilizados na seleção das combinações 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 (2018).

Os resultados dos valores de CIM e ICIF da concentração mais eficaz de cada combinação MPM x fendiona, MPM x Cu-fendiona e MPM x Ag-fendiona são apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente; enquanto para as combinações IMP x fendiona, IMP x Cu-fendiona e IMP x Ag-fendiona são apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente. Nossos resultados revelaram que as associações MPM x fendiona, MPM x Ag-fendiona e MPM x Cu-fendiona apresentaram efeito aditivo para as 11 amostras. As combinações IMP x fendiona, IMP x Ag-fendiona e IMP x Cu-fendiona exibiram efeito sinérgico em 1, 2 e 2 das 11 amostras respectivamente. Destaca-se a ausência de associação indiferente ou antagônica em todas as amostras para todas as combinações testadas.

Tabela 4. Efeito da associação de MPM com fendiona por meio do método de *checkerboard* sobre amostras de *A. baumannii*

Amostras	Substância	CIM da substância sozinha (µg/ml)	CIM da substância combinada (µg/ml)	CIF	ICIF
03B	MPM	32	16	0,5	0,75 (Ad)
	Fendiona	3,12	0,78	0,25	
24B	MPM	16	8	0,5	1,0 (Ad)
	Fendiona	1,56	0,78	0,5	
30B	MPM	32	16	0,5	1,0 (Ad)
	Fendiona	3,12	0,78	0,5	
38B	MPM	16	8	0,5	1,0 (Ad)
	Fendiona	1,56	0,78	0,5	
78B	MPM	16	4	0,25	0,75 (Ad)
	Fendiona	3,12	1,56	0,5	
96B	MPM	64	16	0,25	0,75 (Ad)
	Fendiona	6,25	3,12	0,5	
97B	MPM	64	8	0,12	0,62 (Ad)
	Fendiona	1,56	0,78	0,5	
98B	MPM	64	8	0,12	0,62 (Ad)
	Fendiona	3,12	1,56	0,5	
101B	MPM	64	8	0,12	0,62 (Ad)
	Fendiona	1,56	0,78	0,5	
108B	MPM	32	16	0,5	1,0 (Ad)
	Fendiona	0,78	0,39	0,5	
125B	MPM	32	4	0,12	0,62 (Ad)
	Fendiona	0,78	0,39	0,5	

MPM – meropenem; Sg – sinergismo, definido como um ICIF $\leq 0,5$; Ad – aditividade, definida como ICIF $> 0,5$ a $< 2,0$;

FONTE: O autor

Tabela 5. Efeito da associação de MPM com Ag-fendiona por meio do método de *checkerboard* sobre amostras de *A. baumannii*

Amostras	Substância	CIM da substância sozinha (µg/ml)	CIM da substância combinada (µg/ml)	CIF	ICIF
03B	MPM	32	16	0,5	1,0 (Ad)
	Ag-fendiona	0,78	0,39	0,5	
24B	MPM	16	8	0,5	1,0 (Ad)
	Ag-fendiona	0,78	0,39	0,5	
30B	MPM	32	16	0,5	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	1,56	0,39	0,25	
38B	MPM	16	8	0,5	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	1,56	0,39	0,25	
78B	MPM	16	4	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	1,56	0,78	0,5	
96B	MPM	64	16	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	1,56	0,78	0,5	
97B	MPM	64	8	0,12	0,62 (Ad)
	Ag-fendiona	0,78	0,39	0,5	
98B	MPM	64	16	0,25	0,75(Ad)
	Ag-fendiona	0,78	0,39	0,5	
101B	MPM	64	16	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	1,56	0,78	0,5	
108B	MPM	32	8	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	1,56	0,78	0,5	
125B	MPM	32	4	0,12	0,62 (Ad)
	Ag-fendiona	0,78	0,39	0,5	

MPM – meropenem; Sg – sinergismo, definido como um ICIF $\leq 0,5$; Ad – aditividade, definida como ICIF $> 0,5$ a $< 2,0$;

FONTE: O autor (2019)

Tabela 6. Efeito da associação de meropenem com Cu-fendiona por meio do método de *checkerboard* sobre amostras de *A. baumannii*

Amostras	Substância	CIM da substância sozinha (µg/ml)	CIM da substância combinada (µg/ml)	CIF	ICIF
03B	MPM	32	16	0,5	1,0 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,78	0,5	
24B	MPM	16	8	0,5	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,39	0,25	
30B	MPM	32	8	0,25	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,78	0,5	
38B	MPM	16	4	0,25	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,78	0,5	
78B	MPM	16	8	0,5	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,39	0,25	
96B	MPM	64	32	0,5	1,0 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,78	0,5	
97B	MPM	64	32	0,5	1,0 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,78	0,5	
98B	MPM	64	16	0,25	0,75(Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,78	0,5	
101B	MPM	64	16	0,25	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,78	0,5	
108B	MPM	32	16	0,5	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,39	0,25	
125B	MPM	32	16	0,5	0,62 (Ad)
	Cu-fendiona	3,12	0,39	0,12	

MPM – meropenem; Sg – sinergismo, definido como um ICIF $\leq 0,5$; Ad – aditividade, definida como ICIF $> 0,5$ a $< 2,0$;

FONTE: O autor (2019)

Tabela 7. Efeito da associação de IMP com fendiona por meio do método de *checkerboard* sobre amostras de *A. baumannii*

Amostras	Substância	CIM da substância sozinha (µg/ml)	CIM da substância combinada (µg/ml)	CIF	ICIF
03B	IMP	64	16	0,25	0,5 (Sn)
	Fendiona	1,56	0,78	0,25	
24B	IMP	16	8	0,5	1,0 (Ad)
	Fendiona	0,78	0,39	0,5	
30B	IMP	32	4	0,12	0,62 (Ad)
	Fendiona	0,78	0,39	0,5	
38B	IMP	16	4	0,25	0,75 (Ad)
	Fendiona	0,78	0,39	0,5	
78B	IMP	16	8	0,5	0,75 (Ad)
	Fendiona	0,78	0,19	0,25	
96B	IMP	64	16	0,25	0,75 (Ad)
	Fendiona	0,78	0,39	0,5	
97B	IMP	64	8	0,12	0,62 (Ad)
	Fendiona	1,56	0,78	0,5	
98B	IMP	32	4	0,12	0,37 (Sn)
	Fendiona	1,56	0,39	0,25	
101B	IMP	64	8	0,12	0,62 (Ad)
	Fendiona	1,56	0,78	0,5	
108B	IMP	64	16	0,25	0,75 (Ad)
	Fendiona	0,78	0,39	0,5	
125B	IMP	32	4	0,12	0,62 (Ad)
	Fendiona	0,78	0,39	0,5	

IMP – imipenem; Sg – sinergismo, definido como um ICIF $\leq 0,5$; Ad – aditividade, definida como ICIF $> 0,5$ a $< 2,0$;

FONTE: O autor (2019)

Tabela 8. Efeito da associação de IMP com Ag-fendiona por meio do método de *checkerboard* sobre amostras de *A. baumannii*

Amostras	Substância	CIM da substância sozinha (µg/ml)	CIM da substância combinada (µg/ml)	CIF	ICIF
03B	IMP	64	32	0,5	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	1,56	0,39	0,25	
24B	IMP	16	8	0,5	0,62 (Ad)
	Ag-fendiona	1,56	0,19	0,12	
30B	IMP	32	8	0,25	0,62 (Ad)
	Ag-fendiona	1,56	0,78	0,5	
38B	IMP	16	4	0,25	0,5 (Sn)
	Ag-fendiona	1,56	0,39	0,25	
78B	IMP	16	4	0,25	0,5 (Sn)
	Ag-fendiona	1,56	0,39	0,25	
96B	IMP	64	32	0,5	1,0 (Ad)
	Ag-fendiona	0,78	0,39	0,5	
97B	IMP	64	8	0,12	0,62 (Ad)
	Ag-fendiona	1,56	0,78	0,5	
98B	IMP	32	8	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	0,78	0,39	0,5	
101B	IMP	64	32	0,5	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	0,78	0,195	0,25	
108B	IMP	64	16	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	1,56	0,78	0,5	
125B	IMP	32	8	0,25	0,75 (Ad)
	Ag-fendiona	0,78	0,39	0,5	

IMP – imipenem; Sg – sinergismo, definido como um ICIF $\leq 0,5$; Ad – aditividade, definida como ICIF $> 0,5$ a $< 2,0$;

FONTE: O autor (2019)

Tabela 9. Efeito da associação de IMP com Cu-fendiona por meio do método de *checkerboard* sobre amostras de *A. baumannii*

Amostras	Substância	CIM da substância sozinha (µg/ml)	CIM da substância combinada (µg/ml)	CIF	ICIF
03B	IMP	64	32	0,5	1,0 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,78	0,5	
24B	IMP	16	8	0,5	1,0 (Ad)
	Cu-fendiona	0,78	0,39	0,5	
30B	IMP	32	8	0,25	0,5 (Sn)
	Cu-fendiona	1,56	0,39	0,25	
38B	IMP	16	4	0,25	0,5 (Sn)
	Cu-fendiona	1,56	0,39	0,25	
78B	IMP	16	8	0,5	1,0 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,78	0,5	
96B	IMP	64	32	0,5	1,0 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,78	0,5	
97B	IMP	64	8	0,12	0,62 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,78	0,5	
98B	IMP	32	8	0,25	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	0,78	0,39	0,5	
101B	IMP	64	16	0,25	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,78	0,5	
108B	IMP	64	32	0,5	0,75 (Ad)
	Cu-fendiona	1,56	0,39	0,25	
125B	IMP	32	16	0,5	1,0 (Ad)
	Cu-fendiona	0,78	0,39	0,5	

IMP – imipenem; Sg – sinergismo, definido como um ICIF $\leq 0,5$; Ad – aditividade, definida como ICIF $> 0,5$ a $< 2,0$;

FONTE: O autor (2019)

6.6.2 Curva de tempo-morte

A fim de se verificar os efeitos dos compostos em combinação com carbapenêmicos sobre a taxa de crescimento celular em função do tempo foram selecionadas quatro amostras de *A. baumannii* (30B, 38B, 98B e 101B) que apresentaram valores de CIM para MPM distantes ente si (16 µg/mL a 64 µg/mL).

Os dados mostram que a combinação formada por MPM x Cu-fendiona sobre as amostras, teve uma redução superior a 4 log₁₀ em relação a curva controle de crescimento, porém não evidenciou sinergismo, pois quando comparada ao efeito do composto sozinho não houve redução e as curvas seguiram quase que iguais evidenciando um possível efeito do composto isolado (figura 9). Na combinação formada por MPM x Ag-fendiona observamos uma redução superior a 3 log₁₀ em relação a curva controle, todavia não houve efeito sinérgico, quando comparado com o composto sozinho (figura 10). Apesar da proposta principal deste ensaio ter sido de verificar sinergismo nas combinações analisadas, podemos observar ação bactericida de Cu-fendiona e Ag-fendiona em concentrações subinibitorias (½ CIM) entre 6 a 9 h de experimento, tempo similar ao observado nas curvas dose-resposta.

Figura 9 – Curva tempo-morte das amostras clínicas de *A. baumannii* tratadas com as combinações de MPM x Cu-fendiona

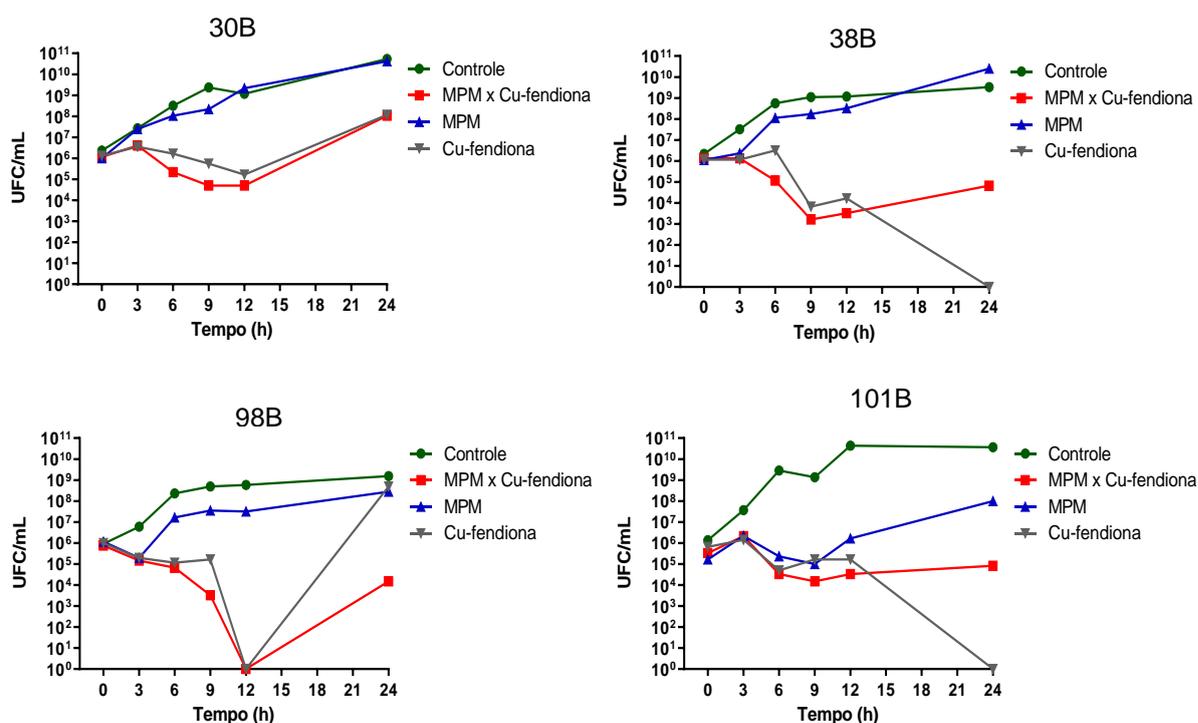
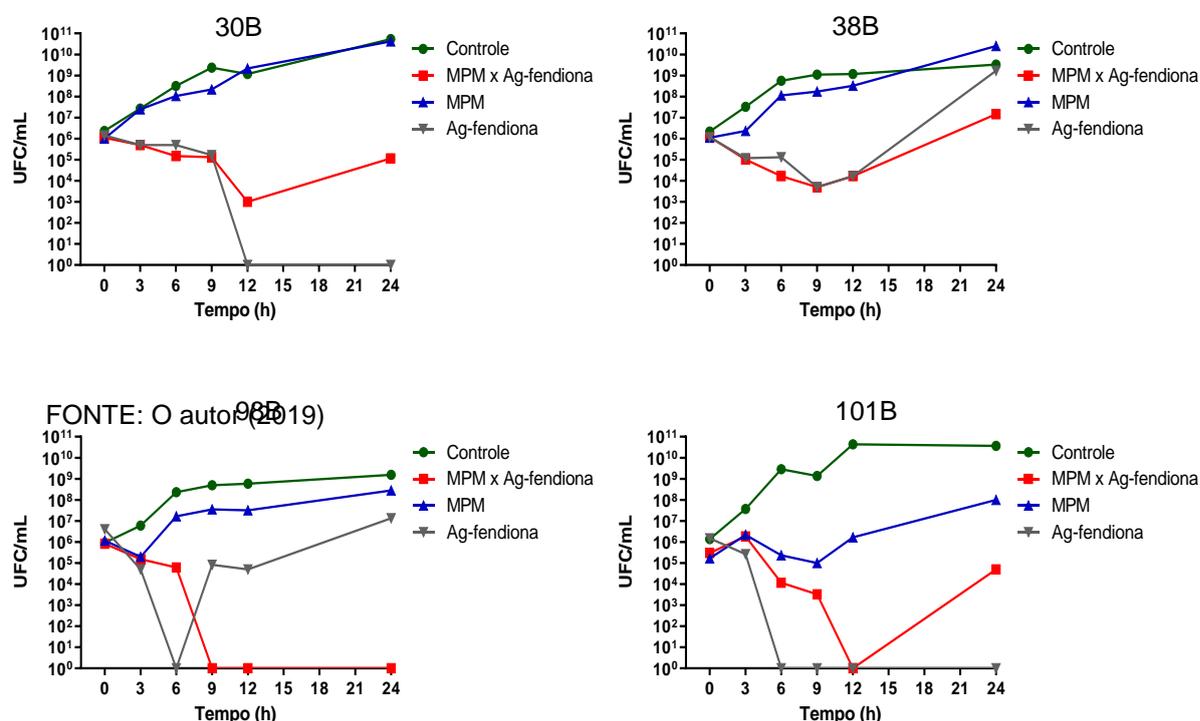


Figura 10 – Curva tempo-morte das amostras clínicas de *A. baumannii* tratadas com as combinações de MPM x Ag-fendiona



FONTE: O autor (2019)

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

6.7.1 Teste de toxicidade de fendiona e seus derivados e do MPM

A avaliação da toxicidade *in vivo* foi realizada em modelo invertebrado de *G. mellonella* com fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona. As taxas de sobrevivência obtidas pela administração dos compostos não exibiram diferenças significativas em relação às taxas obtidas pela administração de PBS, onde 100% das larvas sobreviveram. Esses resultados apontam que os compostos não exerceram efeitos tóxicos consideráveis nas larvas, durante um período de 96 h, na concentração máxima de 400 μ g/mL.

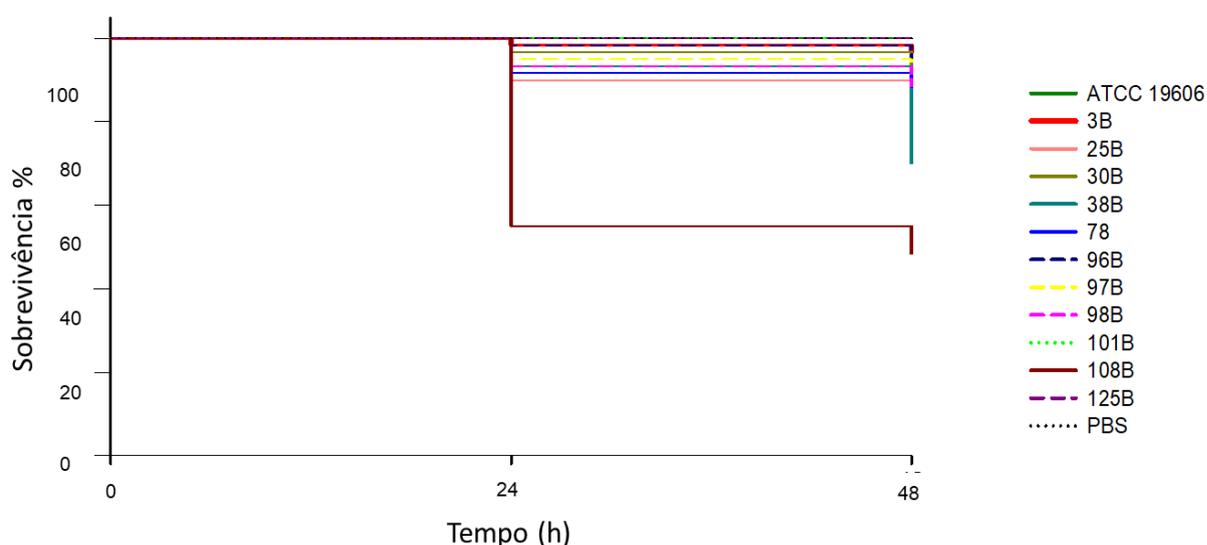
A toxicidade *in vivo* do MPM foi investigada em larvas de *G. mellonella* como processo de padronização para os experimentos seguintes. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as taxas de sobrevivência obtidas pela

administração de MPM, em qualquer uma das concentrações, e PBS onde 100% (20/20) das larvas sobreviveram até a concentração máxima de 400 µg/mL. Os resultados, portanto, demonstram ausência de efeitos tóxicos consideráveis nas larvas durante um período de 96 h.

6.7.2 Infecção e índice de sobrevivência

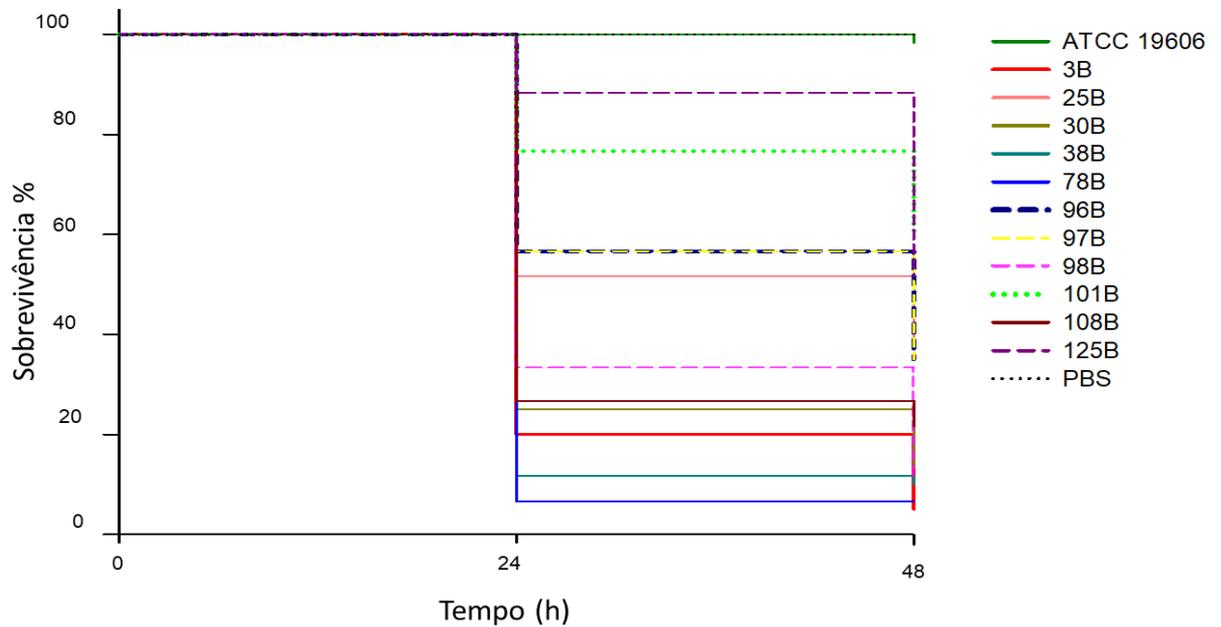
Para este ensaio foram usadas as mesmas 11 amostras selecionadas para o experimento de *checkerboard*. Essas amostras foram avaliadas quanto ao potencial infeccioso em larvas *G. mellonella*. Os resultados foram expressos por meio das taxas de sobrevivência. As amostras ATCC 19606 e 101B não causaram mortalidade significativa nas concentrações de 10^4 e 10^5 UFC/mL em 48 h pós-infecção (figura 11 e 12). Inóculos em concentração de 10^6 UFC/mL foram capazes de levar à morte mais de 90% da população, em todas as amostras testadas, com exceção das amostras ATCC 19606 e 101B (figura 13). A concentração 10^5 UFC/mL foi a que apresentou maior diferenciação entre as amostras, sendo esta a concentração escolhida para os testes posteriores (figura 10). Importante ressaltar que não foi observada morte larvar até 4h pós-infecção por nenhuma das amostras bacterianas, independente da densidade bacteriana testada.

Figura 11 – Taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com inóculo de *A. baumannii* em concentração de 10^4 UFC/mL



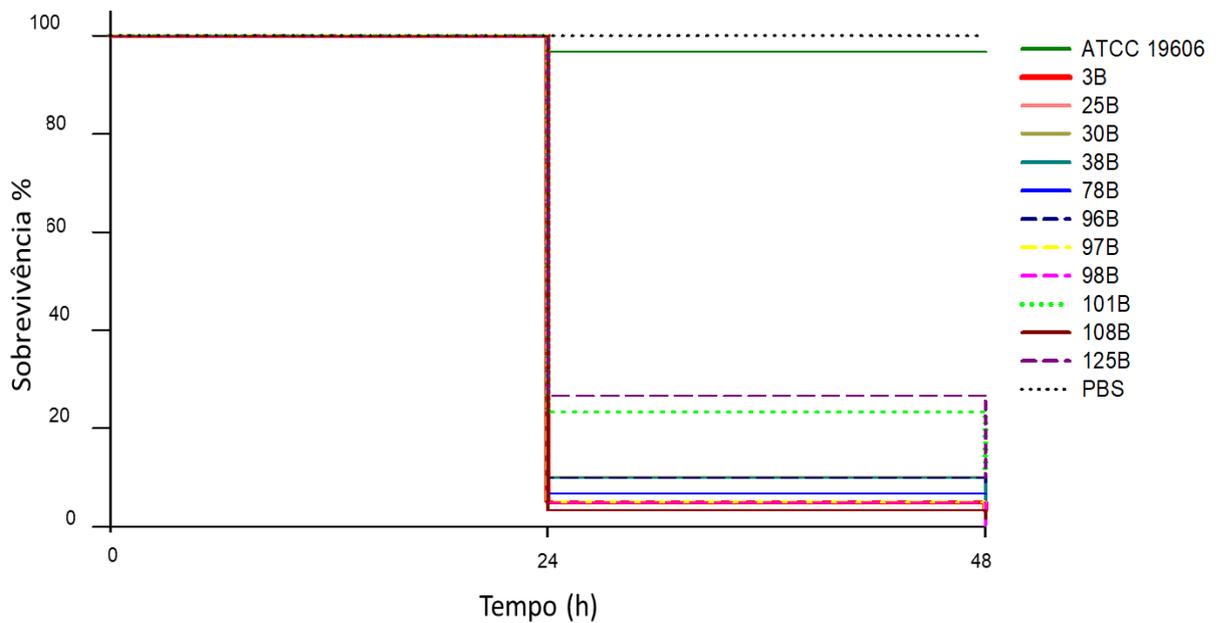
FONTE: O autor (2019)

Figura 12 – Taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com inóculo de *A. baumannii* em concentração de 10^5 UFC/mL



FONTE: O autor (2019)

Figura 13 – Taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com inóculo de *A. baumannii* em concentração de 10^6 UFC/mL

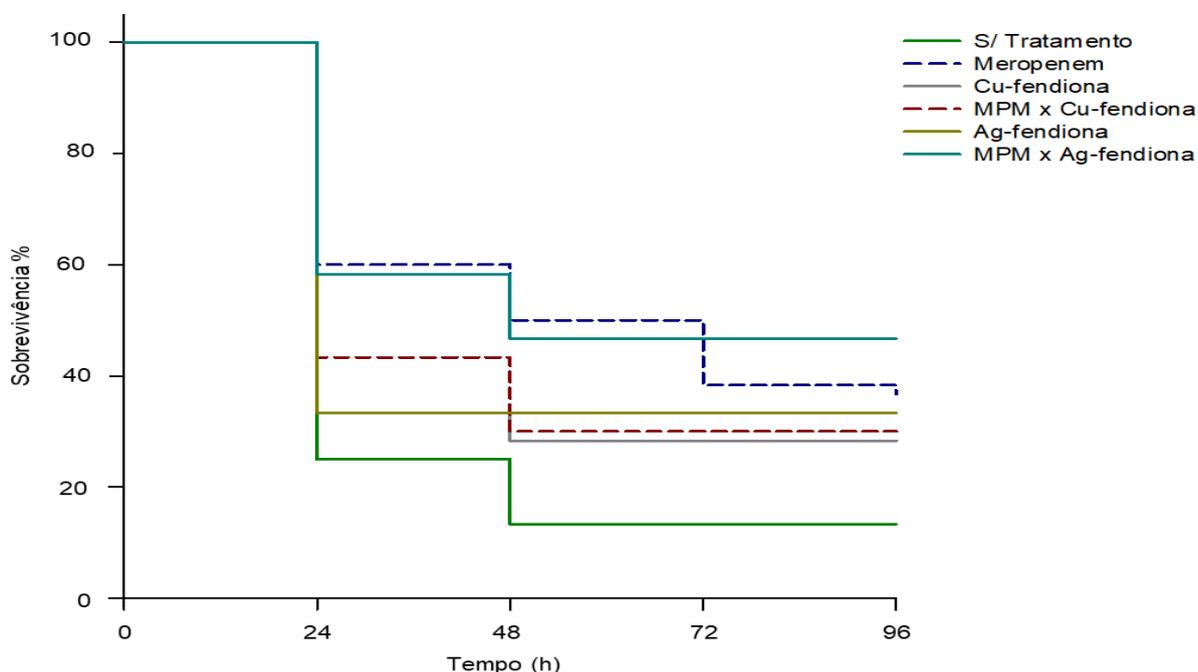


FONTE: O autor (2019)

6.7.3 Avaliação dos efeitos das combinações antimicrobianas através do modelo de infecção em *G. mellonella*

Para este ensaio foram avaliadas duas cepas (30B e 98B) e duas combinações (MPM x Ag-fendiona e MPM x Cu-fendiona). As cepas foram selecionadas por terem apresentado uma maior redução dos valores da CIM dos carbapenêmicos em combinação com os compostos, enquanto as combinações foram selecionadas devido aos resultados obtidos na curva tempo-morte. As larvas foram inoculadas com suspensões bacterianas na concentração de 10^5 UFC/mL das amostras 30B e 98B e, após 30 min, receberam o tratamento antimicrobiano ou PBS estéril (controle não tratado). As curvas de sobrevivência obtidas da administração de MPM x Ag-fendiona e MPM x Cu-fendiona, e desses sozinhos, sobre a amostra 30B estão representadas na figura 14. Observou-se que o grupo sem tratamento exibiu taxa de sobrevivência larvar inferior a 13%, e que os compostos Cu-fendiona e Ag-fendiona sozinhos, na concentração de $\frac{1}{2}$ x CIM apresentaram taxa de sobrevivência inferior a 28% não diferindo significativamente do grupo sem tratamento ($p > 0,05$). O MPM sozinho demonstrou uma pequena diferença significativa para a amostra 30B sem tratamento ($p = 0,003$), porém quando comparado com os demais tratamentos não diferiu estatisticamente. Entretanto, a combinação MPM x Ag-fendiona apresentou a mais elevada taxa de sobrevivência (47%), contudo não apresentou uma diferença significativa com os demais tratamentos, segundo o método de Kaplan-Meier.

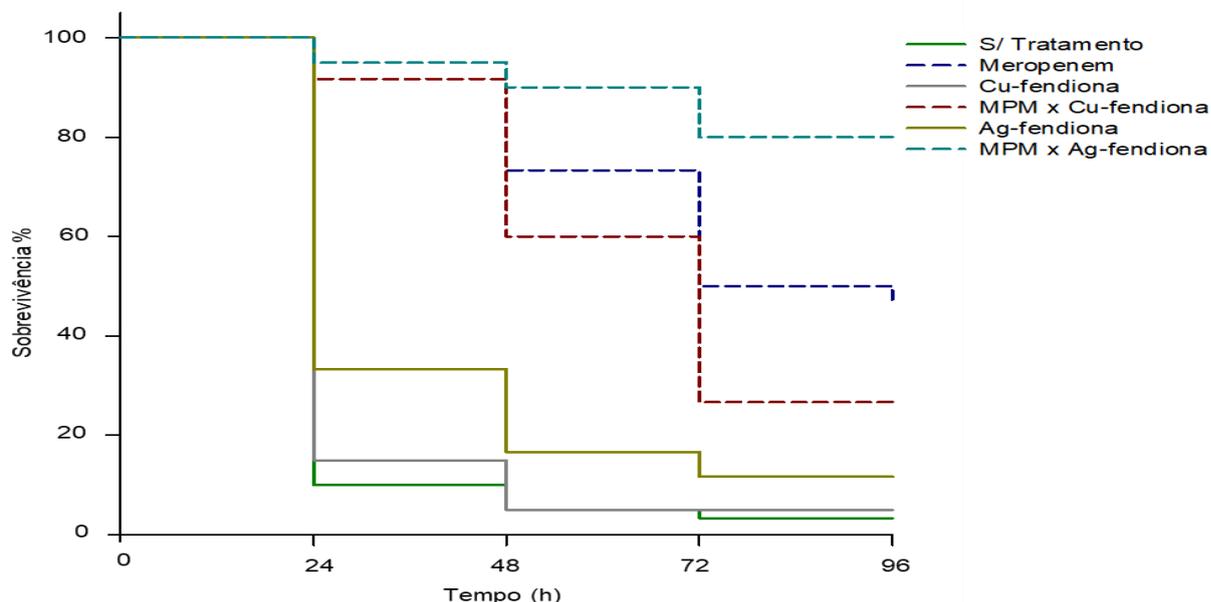
Figura 14 - Taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com a amostra 30B e posteriormente tratadas com MPM, Cu-fendiona e Ag-fendiona sozinhos e combinados entre si.



FONTE: O autor (2019)

Na figura 15, estão representadas as curvas de sobrevivência obtidas da administração de MPM x Ag-fendiona e MPM x Cu-fendiona, e desses sozinhos, sobre a amostra 98B. Observou-se que o grupo sem tratamento exibiu taxa de sobrevivência larvar inferior a 3%, e que os compostos Cu-fendiona e Ag-fendiona sozinhos, na concentração de $\frac{1}{2}$ x CIM não foram efetivos contra a amostra 98B, demonstrando que não houve diferença significativa entre eles e o grupo sem tratamento ($p > 0,05$). O MPM sozinho exibiu atividade superior, gerando taxas de sobrevivência larvar de aproximadamente 47%, contudo, quando comparado a combinação MPM x Cu-fendiona não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,079$). Entretanto, a combinação MPM x Ag-fendiona apresentou a mais elevada taxa de sobrevivência, consistindo em aproximadamente 80% diferindo-se estatisticamente de todos os tratamentos e do grupo não tratado na análise pelo método de Kaplan-Meier.

Figura 15 - Taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com a amostra 98B e posteriormente tratadas com MPM, Cu-fendiona e Ag-fendiona sozinhos e combinados entre si.



FONTE: O autor (2019)

6.8 Efeitos do Ag-fendiona em modelo através de modelo de infecção peritoneal em camundongos

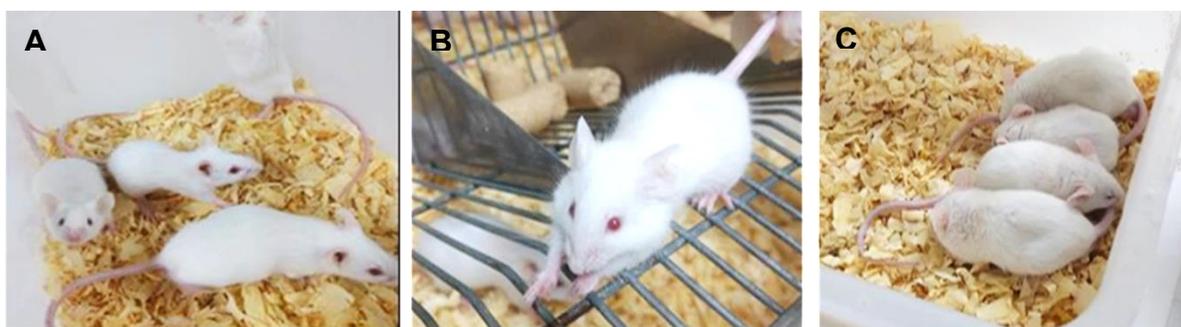
6.8.1 Teste de toxicidade do Ag-fendiona

A avaliação da toxicidade do Ag-fendiona *in vivo* foi realizada em modelo peritoneal em camundongo *Swiss*, sendo verificado que após 120 h, nenhum dos animais foi a óbito com a concentração máxima de 150 mg/Kg. As taxas de sobrevivência obtidas pela administração dos compostos não exibiram diferenças significativas em relação às taxas obtidas pela administração de PBS ou DMSO, onde 100% dos animais sobreviveram (5/5). Os parâmetros que avaliaram a influência do composto sobre atividade geral (contorção, irritabilidade, reflexo corneal, aperto da calda e resposta ao toque, tremores, convulsões) não demonstraram qualquer diferença quando comparadas com o grupo controle. Esses resultados apontam que o composto não exerceu efeitos tóxicos considerável nos animais, em qualquer uma das concentrações testadas.

6.8.2 Determinação da DL₅₀ e sobrevivência pós-infecção

Em conformidade as questões éticas adotadas pelo CEUA para a redução do uso de animais, nesta fase do experimento foram utilizadas nove amostras de *A. baumannii*, a fim de determinarmos a concentração do inóculo a ser empregada nos testes posteriores. Os resultados foram expressos por meio das taxas de sobrevivência, estimadas com base na ausência de resposta ao toque da calda, de tremores, contorção, irritabilidade, reflexos corneal, convulsões (Figuras 16 A, B e C). Os camundongos foram sacrificados quando atingiram alguma dessas condições citadas.

Figura 16 – Alterações fisiológicas e comportamentais dos camundongos



A: Grupo de camundongos saudáveis; **B:** Camundongo infectado com alteração fisiológica: pelos eriçados e agressividade; **C:** Grupo de camundongos infectados com alteração comportamental: agrupados, pouca mobilidade, respiração alterada.

Fonte: Autora (2019)

Na figura 17 (A, B e C) estão apresentadas as curvas de sobrevivência encontradas nas concentrações 10^6 , 10^7 , 10^8 UFC/mL, respectivamente. Todos os camundongos, em todas as concentrações associaram-se a 100% de sobrevivência em 4h pós-infecção. Não foi observada mortalidade significativa nos grupos de camundongos que receberam as concentrações de 10^6 e 10^7 UFC/mL das cepas bacterianas em até 96 h pós-infecção. Na concentração 10^8 UFC/mL o índice de sobrevivência foi 0% (0/5) para os camundongos infectados com as cepas 3B, 30B, 38B e 98B em até 24h pós-infecção. No entanto, as outras quatro cepas (24B, 78B, 101B e 108B) apresentaram índice de sobrevivência de 100% (5/5) em todas as concentrações testadas em 96 h. Este mesmo resultado foi observado para a cepa ATCC 19606 quando comparadas com o controle PBS. Apesar dos animais na

concentração de 10^7 UFC/mL não terem ido a óbito em 96h, os animais apresentavam estados evidentes de estarem em um processo infeccioso sem resolução por apresentarem tremores, contorção, irritabilidades, reflexos corneal.

Figura 17 – Taxas de sobrevivência de camundongos infectados com inóculo de *A. baumannii*

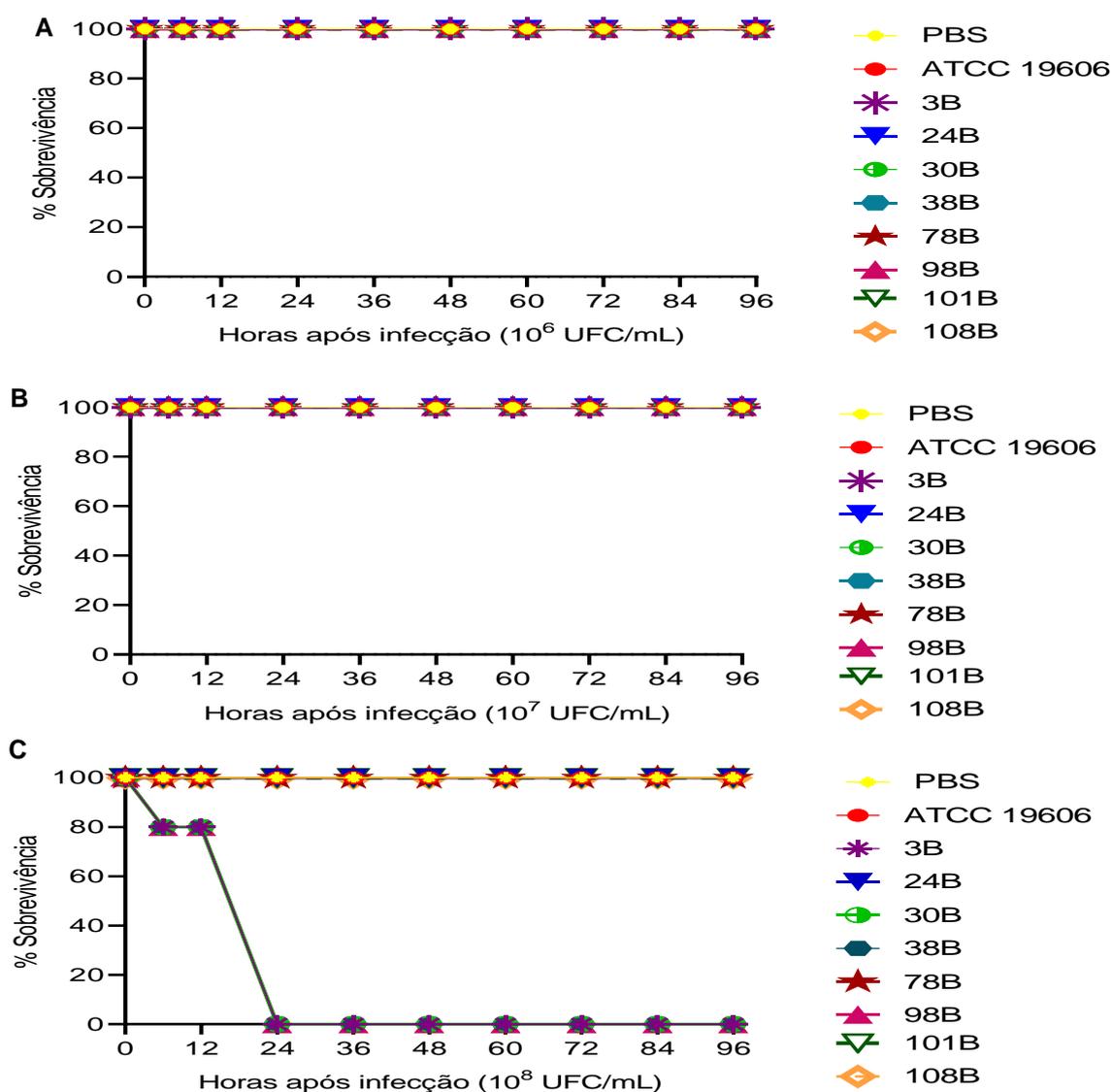


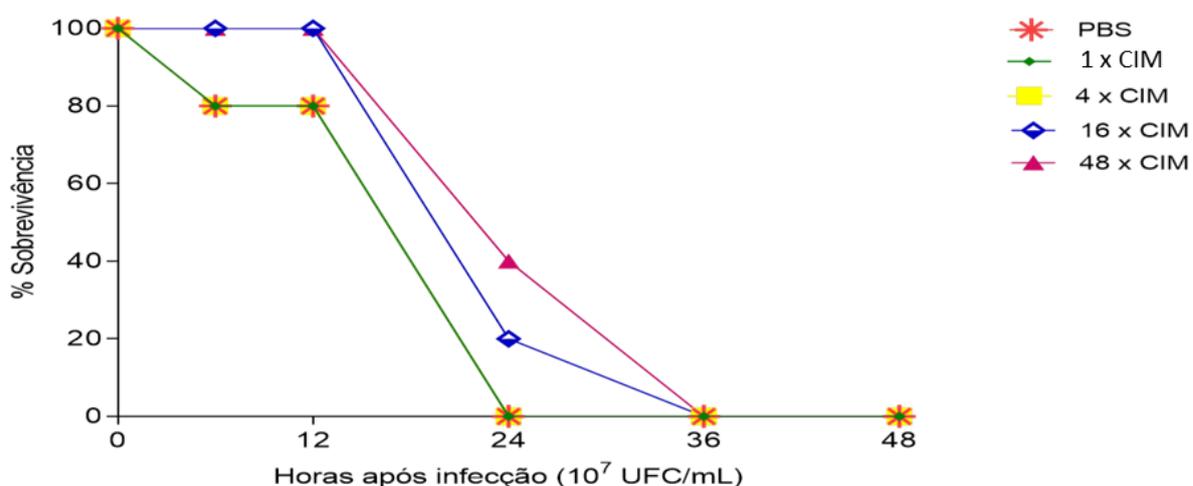
Figura 17 **A:** Curva de sobrevivência do animais inoculados com a concentração 10^6 UFC/ml das amostras de *A. baumannii*; **B:** Curva de sobrevivência do animais inoculados com a concentração 10^7 UFC/ml das amostras de *A. baumannii*; **C:** Curva de sobrevivência do animais inoculados com a concentração 10^8 UFC/ml das amostras de *A. baumannii*;

Fonte: o autor (2019)

6.8.3 Avaliação do tratamento com Ag-fendiona em modelo de infecção peritoneal por *A. baumannii* em camundongos

Para avaliar o possível efeito terapêutico do Ag-fendiona, diferentes concentrações deste composto (1,56, 6,25, 25 e 75 mg/Kg) foram injetados nos camundongos. O experimento foi realizado apenas com a cepa 98B por ter apresentado melhores respostas ao tratamento com os compostos quando avaliado nos testes de dose-resposta, na curva tempo-morte e no teste *in vivo* com *G. mellonella*. Inicialmente inoculamos os animais na concentração de $1,74 \times 10^7$ UFC/mL da amostra 98B e, após duas horas, os camundongos receberam o tratamento do Ag-fendiona ou PBS estéril (controle não tratado). As curvas de sobrevivência obtidas estão representadas na figura 18. Observamos que todos os animais tratados com o composto apresentaram características fisiológicas evidentes de um processo infeccioso sem resolução com tremores, contorção, irritabilidades, reflexos corneal, indo a óbito em até 24h nas concentrações 1,56 e 6,25 mg/Kg. Por outro lado, quando os animais foram tratados com o composto nas concentrações 25 e 75 mg/Kg só foram a óbito após as 24 h do tratamento com o composto.

Figura 18 - Taxa de sobrevivência de camundongos tratados com Ag-fendiona no modelo de peritonite induzido pela cepa 98B de *Acinetobacter baumannii*.



Curva de sobrevivência de camundongos tratados com Ag-fendiona, onde os animais foram inoculados com a cepa 98B de *A. baumannii* e os grupos foram tratados com PBS, 1 x CIM (1,65 mg/Kg), 4 x CIM (6,25 mg/Kg), 16 x CIM (25 mg/Kg) e 48 x CIM (75 mg/Kg)

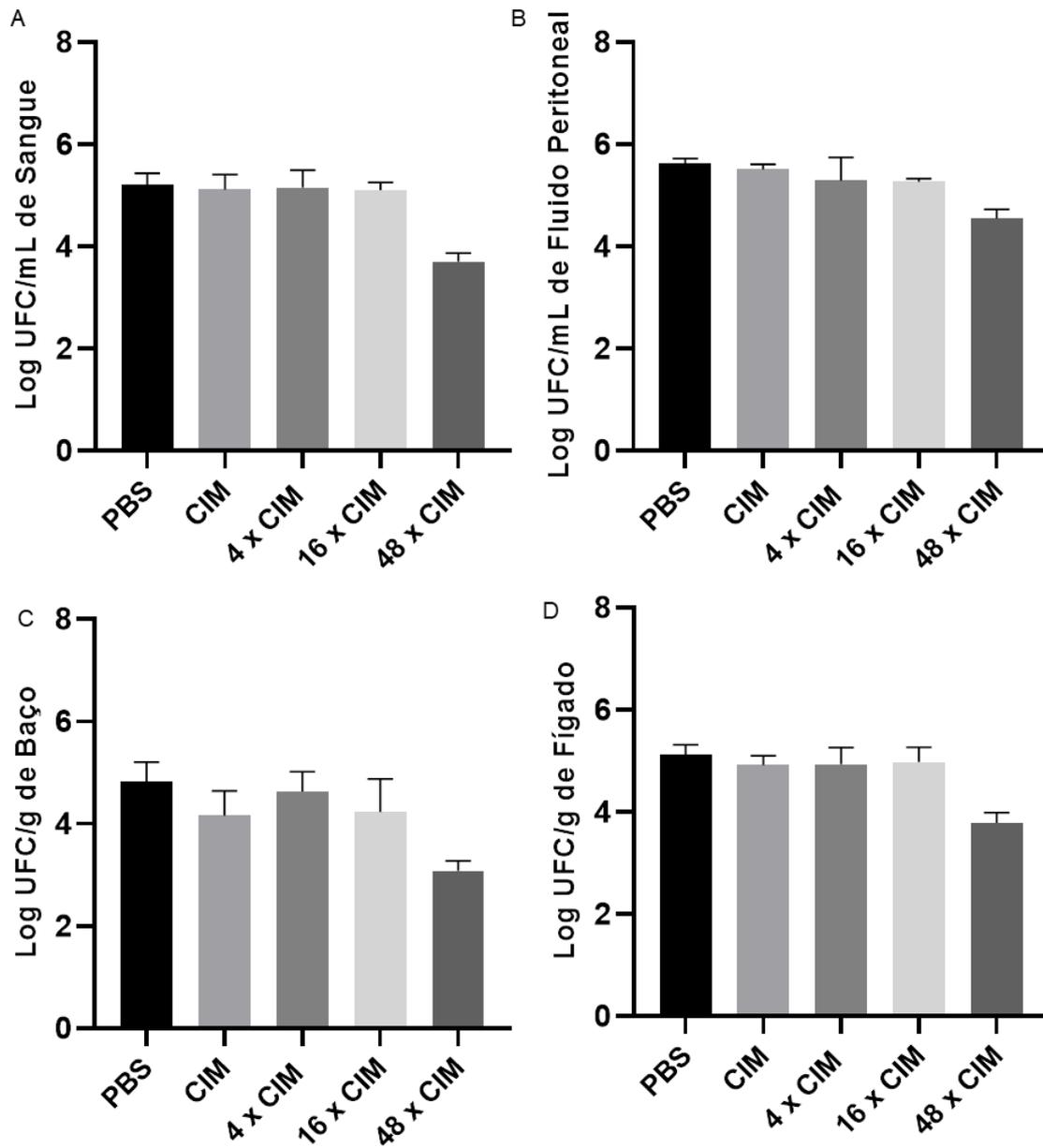
FONTE: O autor (2019)

6.8.4 Quantificação de bactérias no sangue, fluido peritoneal, baço e fígado dos animais.

Para esse ensaio quatro grupos com 5 animais cada receberam uma suspensão contendo 10^7 UFC/mL de *A. baumannii* por via intraperitoneal (i.p). Após 8 h de infecção pela cepa 98B, os animais foram eutanasiados. No sangue e no fluido peritoneal e baço dos animais tratados com 1 x CIM (1,65 mg/Kg), 4 x CIM (6,25 mg/Kg), 16 x CIM (25 mg/Kg) e 48 x CIM (75 mg/Kg) do Ag-fendiona, houve uma redução de $2 \log_{10}$ em relação aos animais tratados apenas com PBS. Quando analisamos o fígado dos animais foi verificado que a redução foi de apenas um \log_{10} quando comparados com o grupo de animais que recebeu apenas o PBS como tratamento para todas as concentrações.

Verificou-se que o número de bactéria viáveis no sangue, fluido peritoneal, baço e fígado diferiu significativamente ($p < 0,0001$) apenas entre os animais tratados com 48 x CIM (75 mg/Kg) em relação as demais concentrações testadas. (Figura 19 A, B, C e D). Observamos que a carga bacteriana recuperada foi aproximadamente 10^3 UFC/mL no sangue e de 10^3 UFC/g no baço e fígado dos animais tratados com 48 x CIM.

Figura 19 – Efeito do Ag-fendiona nos animais



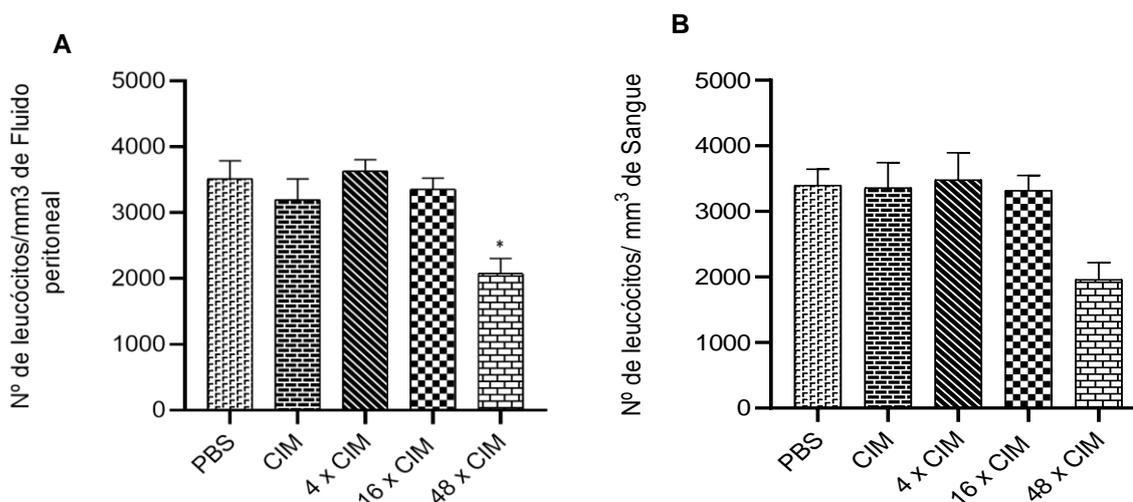
Contagem de bactérias viáveis no sangue (A), fluido peritoneal (B), baço (C) e fígado (D) de animais controles e experimentais após infecção com a amostra 98B. Todos os grupos experimentais e controle foram infectados com a amostra 98B (10^7 UFC/mL) e eutanasiados após 8 h. Os animais foram tratados com 1, 4, 16 e 48 x CIM. O grupo controle recebeu PBS. Os resultados são expressos como média \pm EPM e comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com $p < 0,05$

FONTE: O autor (2019)

6.8.5 Contagem total e diferencial de leucócitos

Na figura 20 (A e B) podemos observar uma redução significativa ($p < 0,0001$) de $2,0 \times 10^3$ células/mm³ na concentração 48 x CIM (75 mg/Kg) pela migração de leucócitos para a cavidade peritoneal nos animais infectados em comparação ao grupo controle ($3,4 \times 10^3$ células/mm³) após a infecção. A mesma concentração também foi capaz de reduzir o número de leucócitos circulantes no sangue ($1,9 \times 10^3$ células/mm³), efeito esse não observado quando os animais foram administrados com as demais concentrações e PBS ($\pm 3,4 \times 10^3$ células/mm³), ($p < 0,0001$). A análise da contagem diferencial de leucócitos no sangue mostrou uma redução do número de linfócitos no grupo 48 x CIM quando comparado ao controle PBS. Não houve alterações no perfil hematológico das populações de neutrófilos, basófilos, monócitos e eosinófilos no sangue dos animais tratados (tabela 10).

Figura 20 – Efeito do Ag-fendiona no sangue e fluido peritoneal dos animais.



Contagem de leucócitos totais no fluido peritoneal e sangue de camundongos após infecção por 98B. **A:** número de leucócitos no fluido peritoneal; **B:** número de leucócitos no sangue. Todos os grupos experimentais e controle foram infectados com a amostra 98B (10^7 UFC/mL) e eutanasiados após 8 h. Os animais foram tratados com 1, 4, 16 e 48 x CIM. O grupo controle recebeu PBS. Os resultados são expressos como média \pm EPM e comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com $p < 0,05$.

FONTE: O autor (2019)

Tabela 10 Contagem total e diferencial de leucócitos em esfregaço do sangue periférico de animais controles e experimentais após infecção por *Acinetobacter baumannii*.

8 horas após o desafio	Tratamento	Total de leucócitos (10 ³ células/mm ³)	Contagem diferencial de leucócitos (10 ³ células/mm ³)				
			Eosinófilo	Linfócito	Neutrófilo	Monócito	Basófilo
	PBS	3,4 ± 0,24	0,0 ± 0,0	2,6 ± 0,13	0,79 ± 0,13	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	CIM	3,36 ± 0,38	0,0 ± 0,0	2,6 ± 0,04	0,75 ± 0,04	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	4 x CIM	3,48 ± 0,41	0,0 ± 0,0	2,6 ± 0,11	0,79 ± 0,11	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	16 x CIM	3,32 ± 0,22	0,0 ± 0,0	2,57 ± 0,10	0,74 ± 0,10	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	48 x CIM	1,96 ± 0,26	0,0 ± 0,0	1,87 ± 0,01*	0,08 ± 0,01*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

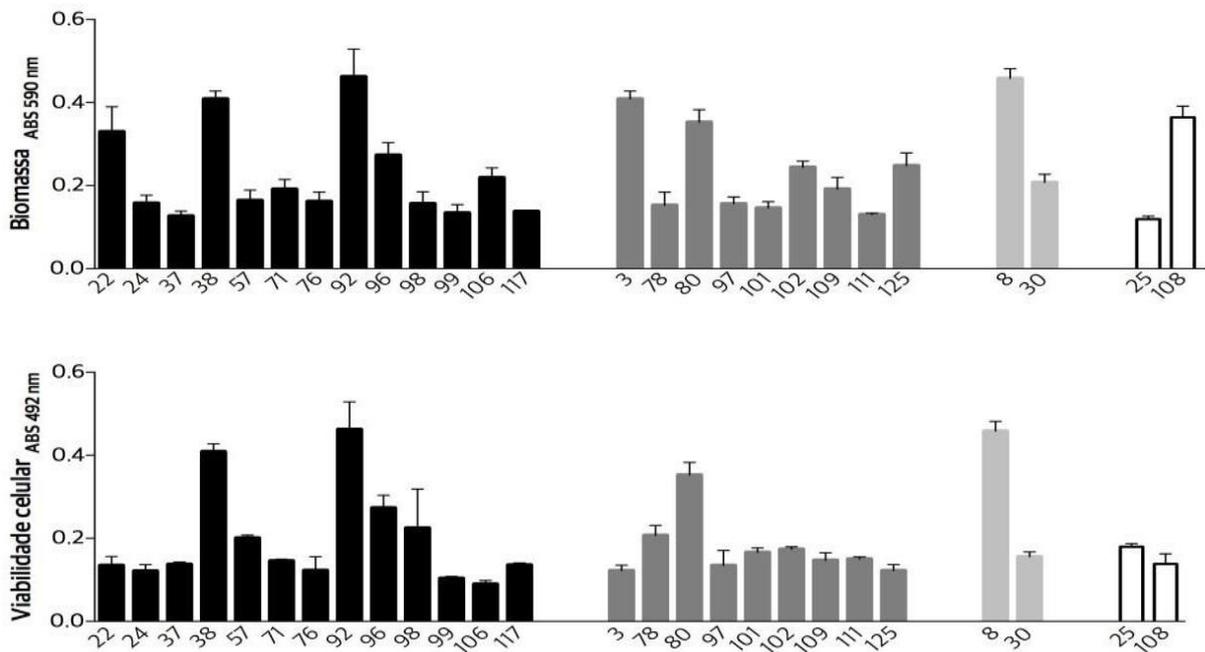
* = Diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais ($p < 0,05$). Os animais foram desafiados (i.p.) com 0,2mL de uma solução contendo 10⁷ UFC/mL de *A. baumannii*. Após 2 horas da infecção, os mesmos receberam (i.p.) PBS ou Ag-fendiona nas concentrações: CIM (1,56 mg/Kg), 4 x CIM (6,25 mg/Kg), 16 x CIM (25 mg/Kg) 48 x CIM (75 mg/Kg) . A contagem foi realizada 8 h após a administração da solução bacteriana. Os resultados são expressos com média ± EPM e a comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com $p < 0,05$.

FONTE: O autor (2019)

6.9 Formação de biofilme

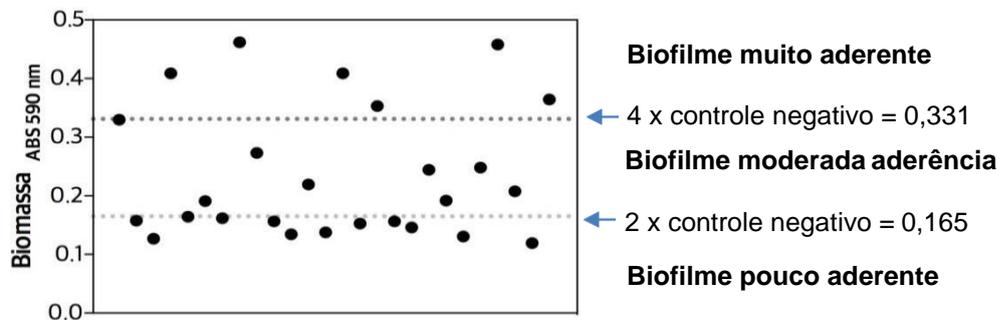
Nossos resultados mostraram que todas as cepas foram capazes de formar biofilme (figura 21); entretanto, em diferentes níveis: 10 amostras (38,46%) foram capazes de formar biofilme pouco aderente, 9 (34,62%) foram capazes de formar biofilme de moderada aderência e 7 (26,92%) foram capazes de formar biofilme muito aderente ao substrato de poliestireno (figura 22).

Figura 21 – Análise da formação de biofilme por diferentes amostras clínicas de *A. baumannii*



FONTE: O autor (2019)

Figura 22 – Intensidade de formação de biofilme em diferentes amostras clínicas de *A. baumannii*.

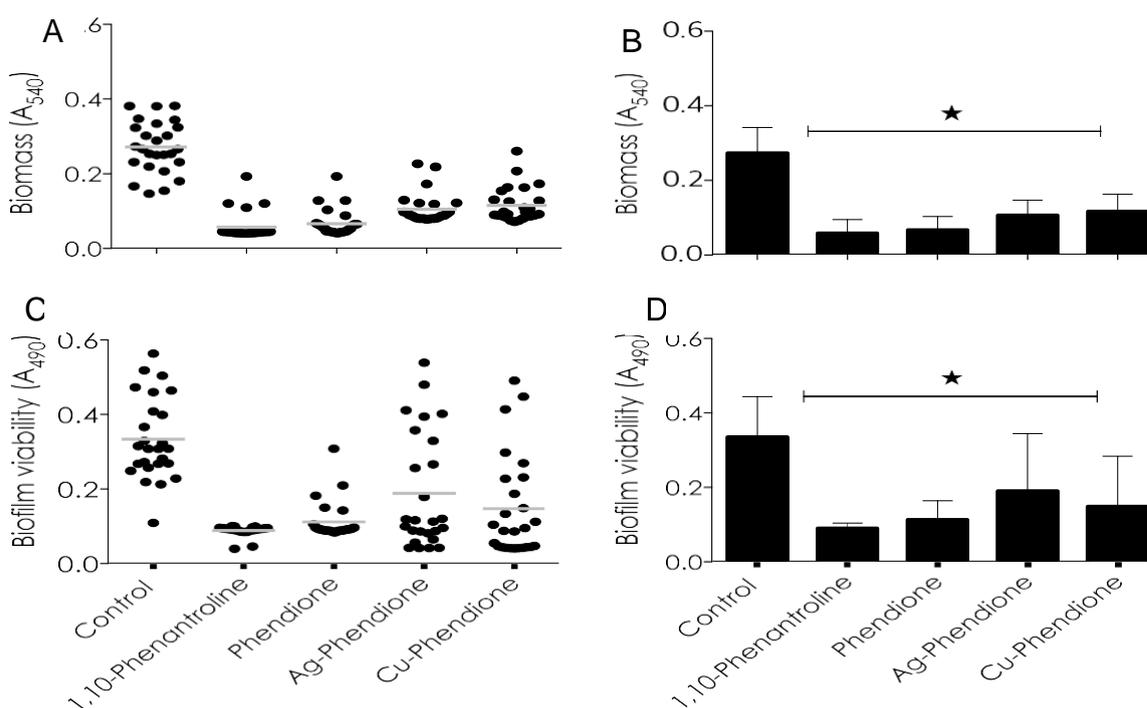


FONTE: O autor (2019)

6.9.1 Efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados na formação de biofilmes

Os efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados na formação de biofilme de 26 amostras de *A. baumannii* foram analisados em relação à biomassa total, através da incorporação do cristal violeta, e em relação à atividade metabólica celular, através da redução do sal XTT. Para este ensaio, 1,10-fenantrolina, fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona foram incubados (concentração equivalente a $\frac{1}{2} \times \text{CIM}$) juntamente com as amostras durante todo período de formação de biofilme. Nossos resultados revelaram que todos os compostos (1,10-fenantrolina, fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona) foram capazes de inibir a formação de biofilme, reduzindo a biomassa em 79%, 76%, 61% e 57%, respectivamente (Figura 23 a e b) e a viabilidade do biofilme 73%, 66%, 43% e 56%, respectivamente (Figura 23 c e d).

Figura 23. Efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados na formação de biofilmes por 26 amostras de *A. baumannii*.



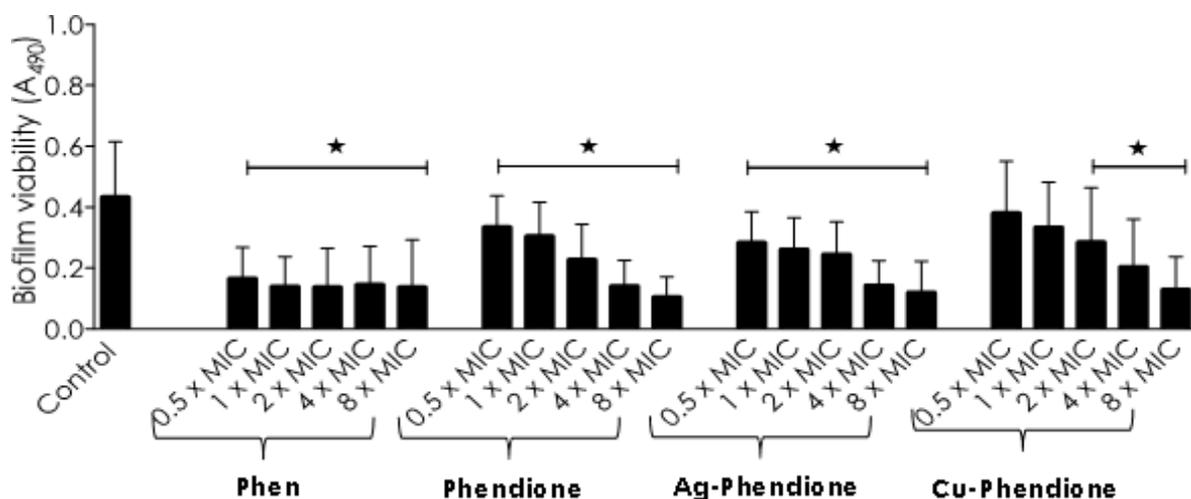
A biomassa do biofilme foi medida por incorporação de cristal violeta e valor de absorvância a 540 nm (A e B), e a viabilidade celular foi quantificada por XTT e valor de absorvância a 490 nm (C e D). A distribuição da biomassa de biofilme (A) e viabilidade (C) em cada amostra clínica em relação a cada sistema analisado foi plotada. Paralelamente, também são mostrados os valores que representam a média + DP referente à biomassa (B) e viabilidade (D) do biofilme para cada sistema analisado. As linhas cinzentas de (A) e (C) indicam a média aritmética da produção de biofilme em cada sistema.

FONTE: O autor (2019)

6.9.2 Efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados na desarticulação de biofilme maduro

Foi analisado também se 1,10-fenantrolina e seus derivados seriam capazes de desarticular o biofilme maduro de *A. baumannii*. Assim, diferentes concentrações dos compostos (100 - 1,56 µg/ml) foram adicionadas aos biofilmes maduros e, em seguida, os sistemas foram incubados por 24 h adicionais. A desarticulação do biofilme maduro foi quantificada através da incorporação do corante cristal violeta e pela redução do sal XTT. Os resultados mostraram que fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona foram capazes de interromper o biofilme maduro reduzindo a viabilidade das células de biofilme de uma forma dependente da dose. Entre estes compostos, Cu-fendiona apresentou a menor concentração necessária para reduzir 50% da viabilidade das células do biofilme ($IC_{50} = 13,54 \mu M$), seguida por Ag-fendiona ($IC_{50} = 22,05 \mu M$) e seu ligante fendiona ($IC_{50} = 34,58 \mu M$) (Figura 24).

Figura 24. Efeitos da 1,10-fenantrolina, fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona sobre o biofilme maduro formado por *A. baumannii*.



Os isolados clínicos ($n = 26$) foram adicionados a um substrato de poliestireno (placas de poliestireno de 96 poços) durante 24 h para formar biofilme. Em seguida, os compostos de teste foram adicionados (concentrações variando de 1,56 a 25 mg/L) a cada poço, e as placas foram incubadas durante mais 24 h. Foi utilizado um controle em que as células bacterianas foram adicionadas a apenas meio de cultura e PBS. Finalmente, a biomassa de biofilme foi medida por incorporação de cristal violeta e medição de absorção a 490 nm após a administração do composto de teste a IC_{50} do biofilme formado. Os valores apresentados representam a média \pm DP referente à biomassa de biofilme para cada composto analisado. As estrelas denotam uma diferença significativa entre células bacterianas não tratadas e tratadas ($P < 0,05$, ANOVA unidirecional, teste de comparação múltipla de Dunnett).

FONTE: O autor (2019)

7 DISCUSSÃO

Considerando que os compostos Cu-fendiona e Ag-fendiona apresentaram uma potente ação antimicrobiana sobre cepas de *P. aeruginosa* (Viganor et al., 2015) e *K. pneumoniae* (PEREGRINO, 2018) produtoras de carbapenemases, buscamos determinar se também tais compostos teriam ação sobre cepas de *A. baumannii* produtoras de carbapenemases.

Acinetobacter baumannii tem se tornado um dos patógenos de grande importância, responsáveis por infecções adquiridas em hospitais no sistema de saúde, principalmente devido à notável capacidade dessa espécie de sobreviver e se espalhar no ambiente hospitalar e de adquirir múltiplos mecanismos de resistência a uma ampla gama de antimicrobianos (NG et al., 2018). Muitos relatos mostraram que *A. baumannii* desenvolve rapidamente resistência a carbapenêmicos (MCCONNELL et al., 2013). Embora as taxas de infecção sejam mais baixas em comparação com outros patógenos gram- negativos, como *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, a maioria dos isolados de *A. baumannii* são considerados multirresistentes (MDR) (HARDING et al., 2018). Diante disso, a OMS (2017) incluiu *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos no grupo crítico da lista de bactérias que representam a maior ameaça à saúde humana, priorizando os esforços de pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos antimicrobianos. As estratégias de resistência a carbapenêmicos em *A. baumannii* incluem a produção de β -lactamase, principalmente β - lactamase da classe D (tipo OXA), responsável por esse fenótipo.

Nosso estudo avaliou 26 cepas de *A. baumannii* classificadas como resistentes a carbapenêmicos e albergando genes de carbapenemases do tipo OXA. Apesar do teste de disco MBL ser direcionado para a detecção de carbapenemases do tipo MBL em BGN (ARAKAWA et al., 2000), consideramos utilizá-lo para a verificação da produção fenotípica de carbapenemases visto a possibilidade das cepas apresentarem carbapenemases do tipo MBL que não foram pesquisadas por métodos genotípicos. Todas as amostras com exceção de uma apresentaram resultado positivo neste teste, confirmando o fenótipo de produção de carbapenemase do tipo MBL. A cepa que apresentou resultado negativo provavelmente tinha uma baixa produção de carbapenemase (BEDENIC et al., 2015; BENEDIC et al., 2019).

O presente trabalho analisou o perfil de suscetibilidade das 26 amostras de *A. baumannii* a outras classes de antimicrobianos. Todas as amostras desse estudo apresentaram uma alta porcentagem de resistência antimicrobiana, com 80,7% (21/26) das cepas sendo classificadas como MDR e 7,7% (2/26) de cepas como PDR. Esses achados concordam com os resultados de estudos semelhantes realizados em outros países (BANSAL et al., 2016; FAZELI et al., 2014; OMER et al., 2015). O conhecimento do perfil de suscetibilidade das amostras principalmente em relação a existência de outros mecanismos de resistência são dados importantes para uma melhor avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos derivados da 1,10-fenantrolina, com destaque para a possibilidade de diferentes mecanismos de resistência apresentados por estas cepas interferirem na ação destes compostos.

Os carbapenêmicos há muito tempo são os medicamentos utilizados no tratamento empírico de infecções causadas por *A. baumannii*, no entanto, podemos observar o aumento da resistência a esses antimicrobianos (KARAIKOS et al., 2019). As amostras selecionadas para este estudo foram classificadas como resistentes ao MPM e IMP. Considerando que o ponto de corte para resistência do CLSI (2018) é maior ou igual a 8 µg/ml, as cepas selecionadas apresentaram resistência a altos níveis de MPM e IMP (CIM₉₀ 64 e 128 µg/ml, respectivamente).

A avaliação inicial da atividade antimicrobiana dos compostos à base de 1,10-fenantrolina e seus derivados fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona em isolados clínicos de *A. baumannii* produtoras de carbapenemases e MDR foi realizada por meio da determinação da CIM e CBM. Nossos resultados mostraram que fendiona e seus complexos Ag⁺ e Cu²⁺ apresentaram atividade inibitória nas células planctônicas de *A. baumannii* em concentrações <10 µM, sendo a Cu-fendiona a ação mais eficiente (tabela 2). Curiosamente, os CIMs da fendiona e seus derivados metálicos foram pelo menos 4 vezes mais baixos para *A. baumannii* quando comparados à *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (VIGANOR et al., 2016; PEREGRINO, 2018) e 1,10-fenantrolina foi 8 vezes mais baixo para *A. baumannii* quando comparados à *P. aeruginosa* (VIGANOR et al., 2016). Em relação à atividade bactericida, os resultados obtidos no teste de determinação da CBM (Tabela 3) indicaram boa atividade bactericida para os compostos, com valores de MG-CBM próximos da MG-CIM. No entanto, 1,10-fenantrolina manteve-se como menos eficiente (MG-CBM = 184,28 µM), mesmo assim, apresentou uma atividade superior,

três vezes mais baixo, quando comparado aos resultados do estudo utilizando amostras de *P. aeruginosa* (VIGANOR et al., 2016).

Ao testar a atividade dos sais $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e AgNO_3 observamos que não houve efeito do sal de cobre sobre o crescimento bacteriano, mesmo na maior concentração testada (801 μM); no entanto, o sal de prata mostrou atividade moderada (MG-CIM = 39,61 μM). A prata tem uma longa história como agente antimicrobiano e o AgNO_3 tem disponibilidade de interagir com as membranas celulares das bactérias (POLÍVKOVÁ et al., 2017). Porém ao compararmos as atividades da prata na forma de sal e complexada à fendiona, observamos uma maior atividade do composto Ag-fendiona, com o valor de MG-CIM cerca de 16 vezes menor, uma diferença que reforça que a atividade antimicrobiana é do complexo e não somente da prata.

A fim de obtermos algumas características farmacodinâmicas como confirmação da ação bactericida, tempo máximo de ação bactericida, e ação bactericida dose-dependente dos compostos Cu-fendiona e Ag-fendiona, realizamos o teste de dose-resposta. Em uma primeira avaliação dos resultados, pudemos observar uma maior ação bactericida para Cu-fendiona entre 6 e 9 h de ação com redução acima de 3 \log_{10} nas concentrações 1 e 4 x CIM, e de até 6 \log_{10} na concentração 16 x CIM. Após esse período houve uma retomada de crescimento o que manifesta uma necessidade de um futuro experimento de reaplicação da dose do composto a cada intervalo de 6 h. O Ag-fendiona apresentou comportamento semelhante ao Cu-fendiona nas mesmas concentrações e período de tempo. Destacamos a concentração de 16 x CIM no Ag-fendiona onde observamos uma erradicação do crescimento bacteriano para três das quatro cepas testadas. Provavelmente esse resultado foi devido aos efeitos bactericidas do íon Ag^+ uma vez que em 16 x CIM já estaria na CIM do próprio metal.

Não houve redução do crescimento bacteriano de maneira dose dependente pois não observamos uma diminuição do tempo ou de crescimento bacteriano para o Cu-fendiona, onde a diferença foi de apenas um \log_{10} entre as concentrações de 1 e 4 x CIM, embora tenha ocorrido uma redução de 2 \log_{10} em 16 x CIM em relação a 4 x CIM entre 6 e 9 h de ação. O Ag-fendiona apresentou comportamento semelhante ao Cu-fendiona havendo igual redução de 3 \log_{10} nas concentrações 1 e 4 x CIM no

período de 6 e 9h. No entanto, apresentou uma redução acima de $5 \log_{10}$ na concentração de $16 \times \text{CIM}$ no mesmo período. Esses resultados reforçam a hipótese de que o efeito bactericida tanto do Cu-fendiona quanto do Ag-fendiona seja dependente do tempo e não da concentração. Ainda, podemos supor que o mecanismo de ação destes compostos esteja relacionado com interação mais estável com os sítios alvos, o que levaria a saturação (ação concentração independente) ou por questões de limite de permeabilidade dos compostos na célula bacteriana, considerando que os mesmos tenham capacidade de serem internalizados.

Ultimamente podemos perceber um aumento rápido da resistência bacteriana e é alarmante que possamos enfrentar o fim da “era dos antimicrobianos”. O sucesso preliminar e aparentemente avassalador dos antimicrobianos tem sido combatido pelo aumento dos mecanismos de resistência e pelo surgimento de muitos gêneros de bactérias resistentes a quase todos os antimicrobianos existentes (MARIE et al., 2015). O surgimento da alta resistência a antimicrobianos em isolados de *A. baumannii* tem impedido o sucesso do tratamento dessas infecções, sendo necessário o uso de opções alternativas de tratamento (TEMOCIN et al., 2015). As terapias alternativas atualmente em prática ou em estudo incluem geralmente um antimicrobiano clássico em associação a uma ou mais substâncias como agentes antimicrobianos, fornecendo uma vantagem sobre as monoterapias (MULANI et al., 2019). Estudos feitos por Santos e colaboradores (2012), demonstraram que a interação entre antimicrobianos clássicos e agentes quelantes podem potencializar a atividade desses antimicrobianos, ao mesmo tempo reduzir a toxicidade dos quelantes ao hospedeiro. Sendo assim, surgem expectativas quanto ao uso da combinação de fendiona e seus derivados a carbapenêmicos contra cepas de *A. baumannii* MDR, com o aumento da resistência a carbapenêmicos e eficácia insuficiente das demais opções de monoterapia, a terapia antimicrobiana combinada tem sido cada vez mais utilizada (KARAIKOS; GIAMARELLOU, 2014).

Dentre os métodos descritos para avaliar os possíveis efeitos das combinações de drogas, o *checkerboard* é o mais indicado para avaliar o sinergismo, o efeito aditivo, antagônico e o indiferente, definidos pelo índice da concentração inibitória fracionada (ICIF), sobre o crescimento das cepas bacterianas analisadas (PILLAI; MOLLERING; ELIOPULOS, 2005; LEITE et al., 2016). Esse

método é extensamente utilizado para avaliar combinações antimicrobianas *in vitro* podendo testar um grande número de combinações sobre um grande número de amostras, gerando alta quantidade de resultados de forma rápida e de fácil interpretação (KIRATISIN et al., 2010). Em nosso estudo determinamos o ICIF de seis combinações diferentes com 11 amostras, as quais consistiam em MPM com fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona e o IMP com os mesmos três compostos. Em nossos resultados, os valores de ICIF da associação dos compostos com os carbapenêmicos variaram em uma faixa de 0,37 até 1,0, indicando a presença apenas de efeito sinérgico ou aditivo em todas as cepas testadas. A ausência de interação antagônica entre antimicrobianos têm importância clínica e, portanto, muitos estudos enfatizam a necessidade de determinar os efeitos interativos das combinações de antimicrobianos *in vitro*, um efeito sinérgico é especialmente benéfico (TEMOCIN et al., 2015). Resultados semelhantes foram observados em amostras de *P. aeruginosa* (SILVA, 2014) e amostras de *K. pneumoniae* (PEREGRINO, 2018), ao testarem a combinação de carbapenêmicos com os compostos 1,10-fenantrolina e seus derivados, onde os valores de ICIF se mantiveram na faixa de sinergismo e aditividade indicando uma homogeneidade nos efeitos obtidos por essas combinações para diferentes espécies de BGN.

As combinações de MPM com fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona apresentaram apenas efeito aditivo em todas as amostras testadas. No entanto, ao avaliarmos o efeito dessas combinações sobre a associação com o CIM dos carbapenêmicos, no método de *Checkerboard*, observamos que houve uma redução da CIM na maioria das amostras testadas de até 4 x CIM do MPM, entretanto não foi observada uma reversão de fenótipo de resistente para sensível de acordo com valores determinados pelo CLSI (2018). Para as combinações de IMP com fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona, observamos um efeito sinérgico em duas amostras para cada combinação. Contudo esse efeito sinérgico não foi capaz de reduzir a CIM dessas amostras para níveis deste carbapenêmico na faixa de suscetibilidade.

Na era da resistência antimicrobiana emergente, dados *in vitro* tornam-se indispensáveis na avaliação do potencial sinérgico e desenvolvimento de novos fármacos (TANGDEN et al., 2017). Os métodos mais frequentes utilizados para avaliar a interação entre fármacos em potencial são o *checkerboard* e curva tempo-morte. No primeiro, apenas a atividade inibitória é avaliada, enquanto que para

estimar parâmetros como atividade bactericida e a potência da atividade da combinação em função do tempo, só são possíveis através da curva tempo-morte (LEITE et al., 2016). Apesar de ambos os métodos poderem fornecer resultados sobre sinergia dos fármacos, no *checkerboard* podemos avaliar um número maior de amostras e combinações após 24h de exposição da bactéria ao fármaco enquanto que para a curva tempo-morte a análise é feita em função do tempo (3 em 3 horas) (LAISHRAM et al., 2017) requerendo um maior tempo de execução da técnica, tornando o trabalho laborioso e demorado. Assim, complementando as análises do método de *checkerboard*, prosseguimos com os testes da curva tempo-morte com um número reduzido de combinações na intenção de verificar se a associação de Cu-fendiona e Ag-fendiona com MPM poderiam apresentar sinergismo. Foram selecionadas quatro amostras de *A. baumannii* com valores de CIM para MPM distantes entre si (16 µg/mL a 64 µg/mL). Os resultados obtidos demonstraram que as combinações testadas não apresentaram sinergismo, como também não houve uma diminuição do carbapenêmico a níveis terapêuticos, o que nos leva a acreditar que o mecanismo de ação desses compostos não parece ser específico sobre a produção de carbapenemases. Se esses compostos atuassem sobre essas enzimas, veríamos uma redução maior na CIM do MPM e IMP, o que não foi observado no método de *checkerboard*. Mas por outro lado, os resultados obtidos deste experimento evidenciaram uma ação bactericida de Cu-fendiona e Ag-fendiona em concentrações subinibitorias ($\frac{1}{2}$ CIM) entre 6 a 9 h de experimento, tempo similar ao observado nas curvas dose-resposta. Esses resultados foram considerados por nós como satisfatório, onde os dados observados no método *checkerboard* com a curva tempo-morte estavam em conformidade, uma vez que esse último é considerado um teste padrão-ouro (LAISHRAM et al., 2017). Soudeiha e colaboradores (2017) não encontraram sinergismo em combinações de MPM a outros fármacos sobre amostras de *A. baumannii*, entretanto os autores relataram uma boa concordância entre os métodos de *checkerboard* e curva tempo-morte. No entanto, num estudo realizado por Tangden e colaboradores (2017) onde compararam esses dois métodos sobre amostras de *A. baumannii*, observaram que não houve correlação entre eles. Existem desafios associados à realização de testes de sinergismo, especialmente porque há uma falta de padrões aceitáveis entre dados obtidos por diferentes métodos (SOPILARA et al., 2010). Comparado ao *checkerboard*, a curva tempo-morte mostra ser mais parecido com o processo

antimicrobiano dinâmico *in vivo* e geralmente exibe um maior sinergismo devido ao seu método de cálculo de sinergia cinética, pois usa o número de colônias como padrão, enquanto que no *checkerboard* utiliza-se fórmulas (JIANG et al., 2018).

Segundo o plano de pesquisa de novos fármacos, inicialmente são analisados *in vitro* para avaliar sua eficácia e potencial toxicidade. De acordo com os resultados obtidos, os candidatos aprovados seguem para uma análise *in vivo*, que é rotineiramente realizada antes dos ensaios clínicos, para confirmar a eficácia e segurança, assim como a obtenção de dados farmacocinéticos que serão importantes para a fase clínica (HORNSEY; WAREHAM, 2011). Assim, com o objetivo de avaliarmos a atividade antimicrobiana da fendiona e seus derivados *in vivo*, investigamos inicialmente os níveis de toxicidade desses compostos em larvas de *G. mellonella*. Para isso, fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona foram administrados nas larvas em diferentes concentrações. As taxas de sobrevivência obtidas demonstraram que fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona, não exibiram mortalidade das larvas significativa em até 96 h de monitoramento mesmo na maior concentração testada (4 µg). Estes resultados corroboram com avaliações realizadas anteriormente por McCann e colaboradores (2012) e Silva (2014), que ao testarem esses compostos em várias concentrações observaram toxidez apenas a partir de 20 µg por larva, com 80% de mortalidade.

Também investigamos uma possível toxicidade do MPM 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 (13,33 mg/kg), corroborando com resultados encontrados por Benthall e colaboradores (2015), onde a dose administrada foi de 20 mg/kg de MPM sem efeitos de toxicidade nas larvas tratadas.

Peleg e colaboradores (2009) demonstraram a adequação de *G. mellonella* como um modelo não mamífero relativamente simples que pode ser usado para facilitar o estudo *in vivo* de interações patógeno-hospedeiro em *A. baumannii* e a eficácia de agentes antimicrobianos. Com base nesse conhecimento, como parte da padronização do teste e caracterização do modelo de infecção, avaliamos os índices de sobrevivência das larvas frente a infecção pelas cepas de *A. baumannii* MDR

usadas neste estudo. Todas as amostras bacterianas, em todas as concentrações, mantiveram 100% de sobrevivência larvar após 4 horas de infecção, as cepas ATCC19606 e 101B não foram capazes de matar as larvas nem na maior concentração testada. Considerando que os melhores indicadores de infecção em *G. mellonella* é a produção de melanina como sinal de inflamação e letalidade em até 48 h de infecção (IGNASIAK; MAXWELL, 2017), observamos que a concentração de 10^5 UFC/mL foi a que apresentou maior diferenciação entre as amostras, sendo esta a concentração escolhida para as amostras 30B e 98B que foram selecionadas para a avaliação da eficácia das combinações dos compostos com MPM, visto que essas cepas nesta concentração causaram 70-90% de letalidade em 48 horas de infecção.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento correspondente a $\frac{1}{2}$ x CIM dos compostos Cu-fendiona e Ag-fendiona sozinhos não foram efetivos para eliminar a infecção provocada pelas amostras 30B e 98B. A taxa de sobrevivência foi baixa para todos os compostos e MPM, sendo que o antimicrobiano sozinho apresentou uma pequena diferença significativa ($p = 0,003$), provocando menos mortes que os compostos. Entretanto a combinação MPM x Ag-fendiona no tratamento da infecção pela amostra 98B apresentou uma taxa de sobrevivência larvar mais elevada (80%). Apesar do resultado ter ocorrido em uma única amostra pode ser considerado indicativo de que exista uma probabilidade da associação ser eficaz pelo fato das substâncias estarem em concentrações subinibitorias. Em seus estudos recentes, Peregrino (2018) obteve sucesso ao combinar MPM e Cu-fendiona em concentrações subinibitorias aumentando a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas por *K. pneumoniae*.

Os modelos murinos são sugeridos como o padrão-ouro para a pesquisa científica, para avaliar a toxicidade e eficácia de novos agentes antimicrobianos *in vivo*, mas eles têm muitas limitações de preocupação ética e logística (SINGKUM et al., 2019). Portanto, escolhemos testar primeiramente a eficácia dos compostos Cu-fendiona e Ag-fendiona sozinhos ou em combinação com MPM em um modelo de infecção por *G. mellonella* devido à sua demonstrada adequação na avaliação da eficácia de novas terapêuticas para infecções por *A. baumannii* e facilidade em obter um número maior de indivíduos antes dos estudos em camundongos (PELEG et al.,

2009; JACOBS et al., 2014). Com a triagem feita após obtermos os resultados em larvas de *G. mellonella*, iniciamos a avaliação no modelo murino com a Ag-fendiona. Inicialmente procuramos investigar o nível de toxicidade desencadeado pelo Ag-fendiona em camundongos *Swiss*. Para isso, Ag-fendiona foi administrado nos animais em diferentes concentrações. As taxas de sobrevivência demonstraram que Ag-fendiona, mesmo na maior concentração testada (150 mg/kg), não exibiu mortalidade significativa em relação às taxas obtidas pela administração de PBS ou DMSO, onde 100 % dos animais sobreviveram (5/5). O mesmo foi obtido por McCann e colaboradores (2012) que observaram toxidez tanto da Ag-fendiona quanto para Cu-fendiona apenas a partir de 300 mg/kg do animal, com 40% de mortalidade. Os parâmetros que avaliaram a influência do composto sobre atividade geral (contorção, irritabilidade, reflexo corneal, aperto da calda e resposta ao toque, tremores, convulsões) não demonstraram nenhuma diferença quando comparadas com o grupo controle.

Também determinamos o inóculo bacteriano considerando que a infecção não poderia ser letal em menos de 24 h e importante salientar que os animais não deveriam estar moribundos em 4 horas. A infecção intraperitoneal de camundongos com cepas de *A. baumannii* geralmente induz uma infecção letal rápida com a maioria dos camundongos morrendo de sepse dentro de 24 horas (HARRIS et al., 2017). Essa observação do tempo de infecção torna-se imprescindível para a eficácia do experimento, pois o tratamento com Ag-fendiona acontece após duas horas pós inoculação bacteriana. A padronização do inóculo também foi examinada, como parte de padronização dos testes para avaliação da eficácia do tratamento com o Ag-fendiona.

Das nove cepas testadas, quatro delas se mostraram mais virulentas na concentração de 10^8 UFC/mL, enquanto que as demais, incluindo a ATCC 19606, apresentaram maior taxa de sobrevivência animal em todas as concentrações testadas em 96 h. Com esse teste verificamos que a amostra 101B, assim como a ATCC19606, apresentaram-se menos virulenta que as demais quando comparamos com os resultados obtidos anteriormente no modelo de larva de *G. mellonella*. Nossos resultados assemelham-se com os encontrados por Luna e colaboradores (2019), onde observaram uma considerável variabilidade em *A. baumannii* e sua respectiva virulência quando testadas em camundongos.

Após a verificação da ausência de toxicidade significativa exercida por Ag-fendiona e da determinação da concentração de inóculo adequada, seguimos para verificar um possível efeito terapêutico do Ag-fendiona em diferentes concentrações deste composto (1,56, 6,25, 25 e 75 mg/Kg). O experimento foi realizado apenas com a cepa 98B por ter sido mais suscetível ao tratamento com os compostos quando avaliado nos testes de dose- resposta, na curva tempo-morte e no teste *in vivo* com *G. mellonella*. Observamos que todos os animais infectados e tratados com o composto nas concentrações 1,56 e 6,25 mg/Kg apresentaram características fisiológicas evidentes de um processo infeccioso sem resolução, indo a óbito em até 24h. Porém quando os animais foram tratados com o composto nas concentrações 25 e 75 mg/Kg só foram a óbito após as 24 h do tratamento com o Ag-fendiona. Observamos que ao aumentar a concentração do composto tivemos um aumento no tempo de sobrevivência dos animais, visto que camundongos infectados por *A. baumannii* MDR via intraperitoneal sucumbem à infecção rapidamente. Resultados semelhantes foram observados *in vitro*, onde percebemos que houve uma redução acima de 5 log₁₀ do Ag-fendiona em relação às características farmacodinâmicas.

Assim, ao avaliarmos o efeito do Ag-fendiona no sangue, fluido peritoneal, baço e fígado dos animais tratados com diferentes concentrações do composto, observamos que houve uma redução de até 2 log₁₀ em relação aos animais tratados apenas com PBS. Apesar do composto não ter apresentado capacidade de conter a infecção, vale ressaltar a diminuição da carga bacteriana. Verificou-se que o número de bactéria viáveis no sangue, fluido peritoneal, baço e fígado diferiu significativamente ($p < 0,0001$) apenas entre os animais tratados com 75 mg/Kg em relação as demais concentrações testadas. Observamos que a carga bacteriana recuperada foi de aproximadamente 10³ UFC/mL no sangue e de 10³ UFC/g no baço e fígado dos animais tratados com 75 mg/Kg. Ainda nessa concentração verificamos uma redução significativa do número de leucócitos do sangue periférico.

Apesar do Ag-fendiona não ter tido uma ação curativa para a infecção causada por *A. baumannii* MDR, o conjunto dos resultados nos mostrou que houve um efeito antimicrobiano parcial na concentração de 75 mg/Kg, equivalente a 48 x CIM. A partir destes resultados formulamos algumas hipóteses sobre como a interferência de alguns parâmetros farmacocinéticos poderiam estar relacionadas com os resultados obtidos como distribuição do composto no fluido peritoneal,

presença de biofilme e diminuição da concentração do Ag-fendiona pela associação com elementos do soro (Ex: proteínas plasmáticas). De forma a buscar algumas respostas, determinamos a CMI para Ag-fendiona na presença e na ausência de soro humano para 4 amostras de *A. baumannii* (incluindo a amostra 98B) e não observamos incremento na CMI. Também, avaliamos a CMI na presença e na ausência de biofilme e verificamos um aumento de 8 vezes a CMI (dados não mostrados). Tais resultados preliminares indicaram que parâmetros farmacodinâmicos como a produção de biofilme e farmacocinéticos relacionados com a distribuição, absorção ou excreção do composto devem estar relacionados com a ausência de efeito antimicrobiano em concentrações que apresentaram atividade bactericida *in vitro*. Portanto, sugerimos que novas avaliações em modelo murino tenham como objetivo a obtenção de dados farmacocinéticos como concentração máxima, meia-vida, taxa de excreção de forma que possam auxiliar nas simulações do esquema de dose e intervalo de doses preconizadas no modelo de estudo baseados em PK/PD. López-Rojas e colaboradores (2017) utilizaram modelos PK/PD tanto *in vivo* no intuito de desenvolver um novo fármaco contra *A. baumannii* obtendo importantes informações que possam prever resultados clínicos favoráveis.

Devido a capacidade de *A. baumannii* acumular resistências a antimicrobianos e persistir no ambiente hospitalar, umas das características relacionadas à produção de biofilme (DOLZANI et al., 2019), nosso estudo também avaliou os efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre o biofilme bacteriano. Primeiramente observamos que 100 % das amostras foram capazes de produzir biofilme, mesmo que em diferentes níveis de aderência ao substrato de poliestireno. O biofilme é uma estrutura bem conhecida de resistência contra estresses químicos e físicos, produzida por vários microrganismos, incluindo bactérias patogênicas humanas (LEE et al., 2017; WI; PATEL, 2018). O presente estudo demonstrou que todos os compostos testados reduziram significativamente a formação de biofilme, considerando a atividade de biomassa e metabólica, em isolados de *A. baumannii* na superfície de poliestireno em concentrações de até 10 vezes a CIM calculada para o crescimento planctônico. Além disso, fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade de células bacterianas, mesmo quando incorporadas em uma estrutura madura de biofilme. Resultados

semelhantes foram relatados por Viganor e colaboradores (2016) ao biofilme formado por *P. aeruginosa*, no qual fendiona e seus complexos Ag^+ e Cu^{+2} foram capazes de interromper o biofilme maduro de maneira dependente da dose. Seria interessante explorar ainda mais os mecanismos de interferência desses compostos na formação de biofilme, que podem abrir novas janelas para usar esses compostos como uma estratégia anti-virulência (anti-biofilme), a fim de combater *A. baumannii* produtoras de carbapenemases.

Diante da enorme busca pelo desenvolvimento de novos fármacos no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, o presente estudo demonstrou o potencial antimicrobiano dos compostos 1,10-fenantrolina e seus derivados contra amostras de *A. baumannii* produtoras de carbapenemases. Neste contexto, Ag-fendiona e Cu-fendiona se destacaram como possíveis candidatos a fármacos usados sozinhos ou em combinação para o tratamento de infecções persistentes de *A. baumannii*, por apresentarem resultados satisfatórios quanto sua toxicidade em dois modelos *in vivo*. Além disso, esses compostos também apresentam uma atividade antimicrobiana potente e promissora contra células planctônicas e em biofilme de *A. baumannii* MDR. Coletivamente, esses dados demonstram a capacidade desses compostos como candidatos antimicrobianos contra *A. baumannii* MDR produtoras de carbapenemases.

8 CONCLUSÕES

Os compostos 1,10 – fenantrolina e seus derivados, fendiona, Ag- fendiona e Cu-fendiona apresentam atividade antimicrobiana satisfatória contra as amostras de *A. baumannii* produtoras de carbapenemases, assim como excelente efeito bactericida em concentração abaixo de 2 µg/mL;

A existência de múltiplos mecanismos de resistência a diferentes classes de antimicrobiano não interferiram na atividade antimicrobiana dos compostos, já que todas as cepas apresentaram o mesmo resultado de CIM;

Os compostos apresentaram sinergismo e aditividade quando combinados ao antimicrobiano IMP e efeito aditivo em todas as combinações dos compostos com o MPM;

As combinações dos compostos Ag-fendiona e Cu-fendiona com o MPM, contendo ½ x CIM de cada agente, demonstraram efeito aditivo por 6 horas, contra cepas de *A. baumannii*, destacando-se maior eficiência da combinação Ag-fendiona com MPM em erradicar a bactéria;

Ag-fendiona e Cu-fendiona apresentaram ação bactericida em 6 h, porém a ação não foi de maneira dose-dependente;

Fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona não provocaram toxicidade aguda *in vivo* conforme verificado em modelo de infecção de *G. mellonella* e camundongo na concentração máxima de 13,33 e 150 mg/kg, respectivamente;

A combinação do composto Ag-fendiona com o MPM aumentou a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *A. baumannii*, quando comparada aos agentes sozinhos;

O composto Ag-fendiona foi capaz de reduzir a infecção provocada por *A. baumannii* em um modelo de infecção intraperitoneal em camundongos na concentração de 75 mg/Kg;

Os compostos foram capazes de inibir a formação e a viabilidade metabólica do biofilme e, ainda, desarticularam o biofilme maduro de *A. baumannii*

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-GETHAMY M. M. et al. Risk factors associated with multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections at a tertiary care hospital in Makkah, Saudi Arabia - a matched case-control study. **Journal of International Medical Research**, v. 0, p. 1-9, 2017.

ALIRAMEZANI, A. et al. Clonal relatedness and biofilm formation of OXA-23-producing carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environment. **Microbial Pathogenesis**, London, US, v. 99, p. 204-208, 2016.

ANVISA. Rede Nacional de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM, Brasília

<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-de-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-n-13-avaliacao-dos-indicadores-nacionais-das-infeccoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude-iras-e-resistencia-microbiana-do-ano-de-2015>. Acesso em Maio, 2017.

ANTUNES N.T.; FISHER J.F. Acquired class D β -lactamases. **Antibiotics**, v. 3, p. 398–434, 2014.

ARANDA J. et al. Role of *Acinetobacter baumannii* UmuD homologs in antibiotic resistance acquired through DNA damage-induced mutagenesis. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 58, p. 1771–1773, 2014.

ARAKAWA Y. et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **J Clin Microbiol.** v. 38, n. 1, p. 40–43. 2000.

BARDBARI A. M. et al. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates. **Microbial Pathogenesis**. v. 108, p. 122-128, 2017.

BASSETTI M., GINOCCHIO F., MIKULSKA M. New treatment options against Gram-negative organisms. **Critical Care**. v. 15, n. 2, p. 215, 2011.

BASSETTI M, et al. Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. **Frontiers in Medicini**. v. 6, p. 74, 2019.

BANSAL A. et al. Antimicrobial susceptibility pattern and detection of metallo-beta-lactamase production in *Acinetobacter* species isolated from clinical samples. **Indian J Appl Res**. v. 6, p. 6–9, 2016.

BAUMANN P.; DOUDOROFF M.; STANIER R. Y. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). **Journal of bacteriology**. v. 95, n. 5, p. 1520–1541, 1968.

BEDENIĆ B. et al. Carbapenemases in Gram-negative bacteria: Laboratory detection and clinical significance. **BioMed Res. Int**. v. 2014, p. 841951, 2014.

BEDENIĆ B. et al. Nursing home as a reservoir of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microb Drug Resist**. v. 21, n. 3, p. 270–8, 2015.

BEDENIĆ B. et al. False positive phenotypic detection of metallo-beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii*. **Acta Clin Croat**. v. 58, n. 1, p. 113–11, 2019.

BEIJERINCK M. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. **Versl Koninklijke Akad Wetensch Amsterdam**. v. 19, p. 1092-103, 1911.

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.

BRISOU J.; PREVOT A. R. Etudes de systématique bactérienne. X. Révision des especes réunies dans le genre *Achromobacter* [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Achromobacter* group]. **Ann Inst Pasteur (Paris)**. v. 86, n. 6, p. 722-728, 1954.

BROWN S. et al. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 11, n. 1, p. 15–23, 2005.

BUSH K.; JACOBY G. A. Updated functional classification of β -lactamases.

Antimicrobial Agents And Chemotherapy. v. 54, p. 969–976, 2010.

CIESLINSKI J. M. et al. .Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence–based PCR. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 77, p. 337–340, 2013.

CIRIONI O. et al. Colistin enhances therapeutic efficacy of daptomycin or teicoplanin in a murine model of multiresistant *Acinetobacter baumannii* sepsis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v. 86, n. 4, p. 392-398, 2016.

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 Disk Susceptibility Tests. 13th ed. CLSI standard M02. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

CODJOE F. S.; DONKOR E. S. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical sciences.** v. 6, n. 1, p. 1-28, 2017.

CROES S. et al. *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. **BMC Microbiology.** v. 229, p. 1-9, 2009.

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

DECOUSSER J. W. et al. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. **Euro Surveill.** v. 18, n. 31, p. 20547, 2013.

DEVEREUX M. et al. Synthesis and biological activity of manganese(II) complexes of phthalic and isophthalic acid: X-ray crystal structures of [Mn(ph)(Phen)(2)(H(2)O)].4H(2)O, [Mn(Phen)(2)(H(2)O)(2)](2)(Isoph)(2)(Phen). 12H(2)O, {[Mn(Isoph)(bipy)](4).2.75bipy}(n)(pH(2) = Phthalic Acid; isoph = Isophthalic Acid; phen = 1,10-Phenanthroline; bipy = 2,2-Bipyridine). **Met Based**

Drugs. v. 7, p. 275-88, 2000.

DOI Y.; MURRAY G.L.; PELEG A.Y. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. **Semin Respir Crit Care Med.** v. 36, n. 1, p. 85–98. 2015.

FIGUEIREDO D. Q. et al. Detection of metallo-beta-lactamases in hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 45, p. 177– 184. 2009.

FAZELI H. et al. Molecular Identification and antimicrobial resistance profile of *Acinetobacter baumannii* isolated from nosocomial infections of a teaching Hospital in Isfahan, Iran. **Avicenna J Clin Microb Infect.** v. 1, p. 1–5, 2014.

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.

GONZALEZ A. L. et al. Efecto del tratamiento antibiótico inicial adecuado sobre la mortalidad en pacientes en estado crítico con bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa*. **Biomédica**, v. 34, supl. 1, 2014.

HARBARTH S.; SAMORE M. H. Antimicrobial resistance determinants and future control. **Emerg Infec Dis.** v. 11, p. 794-801, 2005.

HARDING, C. M. et al. *Acinetobacter baumannii* Strain M2 produces Type IV Pili Which Play a Role in Natural Transformation and Twitching Motility but not Surface-Associated Motility. **mBIO**, v. 4, n.4, p. e00360-13, 2013.

HARDING C. M.; HENNON S. W.; FELDMAN M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nat Rev Microbiol.** v. 16, n. 2, p. 91–102, 2018.

HARRIS G. et al. Mouse Models of *Acinetobacter baumannii* Infection. **Current Protocols in microbiology.** v. 46, n. 1, p. 6G.3.1-6G.3.23, 2017.

HOBMAN J. L.; CROSSMAN L. C. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. **J**

Med Microbiol v.64, p.471-97, 2014.

HORNSEY M.; WAREHAM D. W. *In vivo* efficacy of glycopeptide-colistin combination therapies in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 55, n. 7, p. 3534–3537, 2011.

HOWARD A. et al. *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen. **Virulence.** v.3, p. 243–250; 2012.

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.

JACOBS D. M. et al. Triple combination antibiotic therapy for carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** v. 16, n. 1, p.1-12, 2017.

JACOBY G. A. AmpC beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev.** v. 22, n. 1, p. 161–182, 2009.

JIANG Z.; HE X.; LI J. Synergy effect of meropenem-based combinations against *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. **Infect Drug Resist.** v. 11, p. 1083-1095, 2018.

KARAIKOS I. et al. The "Old" and the "New" Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. **Front Public Health.** v. 7, p. 151, 2019.

KIRATISIN P.; APISARNTHANARAK A.; KAEWDAENG S. Synergistic activities between carbapenems and other antimicrobial agents against *Acinetobacter baumannii* including multidrug-resistant and extensively drug-resistant isolates. **International journal of antimicrobial agentes.** v. 36, n. 3, p. 243-246, 2010.

KOBS V. C. et al. The role of the genetic elements *bla*OXA and *ISAba1* in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in carbapenem resistance in the hospital setting. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasilia.** v.49, p.433-440, 2016.

LAISHRAM S. et al. An update on technical, interpretative and clinical relevance of

antimicrobial synergy testing methodologies. **Indian J Med Microbiol.** v. 35, p. 445-68. 2017.

LEE C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 7, p. 55, 2017.

LEITE G. C. et al. Antimicrobial Combinations against Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. **PLoS ONE.** v. 11, n. 3, p. e0151270, 2016.

LEMIRE J. A. et al., Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nat Rev Microbiol.** v. 11, p. 371–384, 2013.

LIN M. F.; LAN C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World J. Clin. Cases.** v. 2, n. 12, p. 787–814, 2014.

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.

LÓPEZ B. M. et al. Vigilancia institucional de la susceptibilidad antimicrobiana en patógenos de interés clínico. **Boletín médico del Hospital Infantil de México.** v. 70, n. 3, p. 222-229, 2013.

LÓPEZ-ROJAS R. J. et al. Pre-clinical studies of a new quinolone (UB-8902) against *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 38, n. 4, p. 355-359, 2011.

LUNA B. M. et al. Natural history of *Acinetobacter baumannii* infection in mice. **PLoS One.** v. 14, n. 7, p. e0219824, 2019.

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

MARIE M. A. et al. A prospective evaluation of synergistic effect of sulbactam and tazobactam combination with meropenem or colistin against multidrug resistant

Acinetobacter baumannii. **Bosn J Basic Med Sci**. v. 15, n. 4, p. 24–29, 2015.

MATEO-ESTRADA V. et al. Phylogenomics Reveals Clear Cases of Misclassification and Genus-Wide Phylogenetic Markers for *Acinetobacter*. **Genome Biol Evol**. v. 11, n. 9, p. 2531–2541, 2019.

MATHERS A. J. et al. First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: The “menace” arrives in the new world. **J. Clin. Microbiol**. v. 51, n. 2, p. 680–683, 2013.

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. 17, n. 6, p. 635-645, 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 .2012 (a).

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

MCCONNELL M. J.; ACTIS L.; PACHÓN J. *Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 37, n. 2, p. 130–155, 2013.

MENDELSON M. Role of antibiotic stewardship in extending the age of modern medicine. **South African medical journal**. v.10, n. 5, p. 414-428, 2015.

MULANI M. S. et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Front Microbiol**. v. 10, p. 539, 2019.

MUGNIER P. D. et al. Worldwide dissemination of the *bla*OXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerg Infect Dis**. v. 16, n. 1, p. 35–40, 2010.

MUNOZ-PRICE L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect. Dis.** v. 13, p. 785–796, 2013.

MURRAY E. J. B. et al. **Manual of clinical microbiology** 8th edition. 2007.

NG D. H. L. et al. Environmental colonization and onward clonal transmission of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) in a medical intensive care unit: the case for environmental hygiene. **Antimicrob Resist Infect Control.** v. 7, p. 51, 2018.

NICOLAU D. P. Carbapenems: a potent class of antibiotics. **Expert Opinion on Pharmacotherapy.** v. 9, n. 1, p. 23-37, 2008.

NIGRO S. J.; HALL R. M. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the oxa23 carbapenemase gene. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 71, p. 1135-1147, 2016.

OLIVA A. et al. *In-Vitro* Evaluation of Different Antimicrobial Combinations with and without Colistin Against Carbapenem- Resistant *Acinetobacter Baumannii*. **Molecules.** v. 24, n. 5, p. 886, 2019.

OLIVEIRA R. S. B. et al. Inflammation induce by phytomodulatory proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. **Inflamm. Res.** v. 61, n. 7 p. 689- 698, 2012.

OMER M. I. et al. Prevalence and resistance profile of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from a private hospital in Khartoum, Sudan. **Am J Microbiol Res.** v. 3, p. 76– 79, 2015.

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

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

PATON R. et al. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Int. J. Antimicrob. Agents.** v. 2, p. 81–87. 1993.

PENDLETON, J. N.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. v. 11, n. 3, p. 297–308, 2013.

PELEG A. Y.; SEIFERT H.; PATERSON D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev**. v. 21, n. 3, p. 538–582, 2008.

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.

PEREGRINO, I. V. Efeitos da 1,10 Fenantrolina-5,6-Diona e seus derivados metálicos sobre amostras clínicas de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC; Potencial Sinérgico com carbapênicos. Dissertação (mestrado - Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas)- Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, 2018.

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

POLÍVKOVÁ M. et al. Antimicrobial treatment of polymeric medical devices by silver nanomaterials and related technology. **Int J Mol Sci**. v. 18, n. 2, p. 419, 2017.

QI L. et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Front. Microbiol**, v. 7, p. 483, 2016.

QUEENAN A. M.; BUSH K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. **Clin. Microbiol. Rev**. v. 20, p. 440–458, 2007.

RAHMAN S. et al. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum β -lactamases. **Biomed. Res. Int**. v. 9519718, 2018.

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.

ROBLEDO I. E. et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico.

Antimicrob Agents Chemother. v. 54, n. 3, p. 1354–1357, 2010.

Rodríguez-Baño J. et al. Long-term control of hospital-wide, endemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* through a comprehensive "bundle" approach. **American journal of infection control.** v. 37, n. 9, p. 715–722, 2009.

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.

RUNNEGAR N., et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 10-year period. **J. Clin. Microbiol.** v. 48, p. 4051–4056, 2010.

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

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.

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, 2014 (a).

SILVA L. V. et al. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Int. J. Med. Microbiol.** v. 308, p. 990-1000, 2014 (b).

SINGKUM P. et al. Powerful *in vivo* alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. **Acta Microbiol Immunol Hung.** v. 66, n.1, p. 31-55, 2019

SMITH P. W. et al. Pharmacokinetics of β -lactam antibiotics: clues from the past to help discover long-acting oral drugs in the future. **ACS Infect Dis.** v. 4, n. 10, p. 1439–1447, 2018.

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.

STEPANOVIC S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. **J Microbiol Methods.** v. 40, p. 175-179, 2000.

TÄNGDÉN T. et al. Assessment of early combination effects of colistin and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in dynamic time-kill experiments. **Infectious Diseases.** v. 49, n. 7, p. 521-527, 2017.

TILLOTSON G. S. Where does novel antibiotics ReD stand among other pharmaceutical products: an industrial perspective?. **Expert Rev. Anti. Infec.** v. 6, n. 5, p. 551-552, 2008.

TEMOCIN F. et al. Synergistic effects of sulbactam in multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Braz. J. Microbiol.** v. 46, n. 4, p. 1119- 1124, 2015.

TURTON J. F. et al. The role of *ISAba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol Lett.** v. 258, n. 1, p. 72–7, 2006.

UMERSKA A. et al. Synergistic effect of combinations containing EDTA and the antimicrobial peptide AA230, an Arenicin-3 derivative, on gram-negative bacteria. **Biomolecules.** v. 8, n. 4, p. 122, 2018.

VANEECHOUTTE M. et al. *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods. In *Manual of Clinical Microbiology*, 10th edn, p. 714–738. Washington, DC: American Society for Microbiology. 2011.

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, 2016.

VILA J.; MARTÍ S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 59, n. 6, p. 1210–1215, 2007.

WALSH T. R. et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: An environmental point prevalence study. **The Lancet Infect. Dis.** v. 11, p. 355–362, 2011.

WANG J. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains with NDM-1: Molecular characterization and in vitro efficacy of meropenem-based combinations. **Exp Ther Med.** v. 18, n. 4, p. 2924–2932, 2019.

WATKINS R. R.; BONOMO R. A. Increasing prevalence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and strategies to avert a looming crisis. **Expert Rev. Anti-Infect. Ther.** v. 11, p. 543–545, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>. 2017.

WONG D. et al. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 30, p. 409–447, 2017.

WRIGHT M. S. et al. New Insights into Dissemination and Variation of the Health Care-Associated Pathogen *Acinetobacter baumannii* from Genomic Analysis. **mBio.** v.5, p.1-13, 2014.

ZHAO S. et al. An investigation of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in a comprehensive hospital of East China. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.** v. 14, p. 1-8, 2015.

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.