



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEANDRO AFONSO DA SILVA

**EFEITO DA FLUOPSINA C EM *Acinetobacter baumannii*
EXTENSIVAMENTE RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS:
ATIVIDADE ANTIBIOFILME E INTERAÇÃO COM A
POLIMIXINA B**

Londrina
2021

LEANDRO AFONSO DA SILVA

**EFEITO DA FLUOPSINA C EM *Acinetobacter baumannii*
EXTENSIVAMENTE RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS:
ATIVIDADE ANTIBIOFILME E INTERAÇÃO COM A
POLIMIXINA B**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Coorientador: Prof. Dr. Juan Carlos Bedoya Pérez

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S586e Silva, Leandro Afonso da.
Efeito da fluopsina C em *Acinetobacter baumannii* extensivamente resistentes aos antimicrobianos: atividade antibiofilme e interação com a polimixina B / Leandro Afonso da Silva. - Londrina, 2021.
78 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.
Coorientador: Juan Carlos Bedoya Pérez.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Fluopsina C - Tese. 2. Antimicrobiano Natural - Tese. 3. Atividade Antibiofilme - Tese. 4. Extensivamente Resistente aos Antimicrobianos - Tese. I. Andrade Filho, Galdino. II. Pérez, Juan Carlos Bedoya . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579

LEANDRO AFONSO DA SILVA

**EFEITO DA FLUOPSINA C EM *Acinetobacter baumannii*
EXTENSIVAMENTE RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS:
ATIVIDADE ANTIBIOFILME E INTERAÇÃO COM A
POLIMIXINA B**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Bárbara Gionco-Cano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 30 de março de 2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida, minha e dos que me cercam. Por tudo o que eu conheço e por tudo que irei conhecer. Agradeço pelos pequenos-grandes momentos em que me sinto vivo.

Agradeço a mim, pela perseverança, por não desistir, por lutar, enfrentar, criar e acreditar. Por sempre tentar melhorar e se esforçar para isso. Digo a mim mesmo: “Parabéns! Você conseguiu. Esse é só o começo”.

Agradeço à minha família, principalmente meus pais e irmãos, que sempre torceram por mim e lutavam quando eu lutava. Agradeço pelas inspirações de homem e mulher que meus pais representam. Meu pai pedreiro e minha mãe costureira que doaram suas vidas para que eu construísse a minha. Também aos meus irmãos, nos quais me espelho, pessoas que “eu quero ser quando crescer”.

Agradeço à minha família acadêmica, pessoas que me auxiliaram a construir o que sou hoje e me permitiram ver oportunidades nas situações mais peculiares. Aprendi muito com estas pessoas durante os cinco anos de graduação e espero que, de alguma forma, eu possa ter contribuído para suas vidas/formação.

Neste trabalho eu agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Galdino Andrade Filho, em primeiro lugar, pelas oportunidades de aprender, me aperfeiçoar e me desenvolver como pesquisador, em segundo, pelo Laboratório de Ecologia Microbiana, o LEM. Este espaço é a consumação de um sonho, um sonho que mudou e muda a vida das pessoas que passam por ele. Agradeço a você por nunca ter desistido deste sonho e por compartilhar comigo essa experiência única que é o LEM.

Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Juan Pérez, pela disponibilidade em todos os momentos em que os pedidos de ajuda foram necessários e pelas ideias significativas aplicadas às minhas pesquisas.

Também à Profa. Dra. Bárbara Gionco-Cano, uma das idealizadoras deste estudo e que atuou orientando cada passo de forma delicada e acessível mesmo quando os cenários pareciam não muito favoráveis.

À Profa. Dra. Floristher Elaine Carrara-Marroni e sua equipe, por possibilitar a execução deste trabalho, provendo todo apoio necessário além de importantes considerações para melhorá-lo.

À Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, pelos brilhantes apontamentos e sugestões, que promoveram importantes reflexões sobre a pesquisa e como descrevê-la, potencializando sua qualidade.

Aos meus queridos companheiros de LEM e amigos de vida, obrigado por tudo que me ensinaram, por tudo que me permitiram vivenciar e participar, por todos os momentos de ajuda e acolhimento. Além de excelentes profissionais vocês são pessoas iluminadas e eu sempre estarei torcendo por vocês.

Meus agradecimentos finais à Universidade Estadual de Londrina, por me acolher e me permitir crescer e vivenciar tantas experiências e, ainda hoje, me deixar a sensação de que há muito a aprender. Este lugar é mágico; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que fomentaram minhas pesquisas e tantas outras na Universidade e também no Brasil.

Agradeço a todas as pessoas inspiradoras que cruzaram meus caminhos. Este trabalho é a finalização de uma etapa muito importante em minha vida e todos vocês fazem parte disto. Obrigado.

SILVA, Leandro Afonso da. **Efeito da fluopsina C em *Acinetobacter baumannii* extensivamente resistentes aos antimicrobianos:** atividade antibiofilme e interação com a polimixina B. 2021. 78 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A resistência de *Acinetobacter baumannii* à diferentes classes de antimicrobianos vem aumentando rapidamente, e isolados resistentes a todos os antibióticos comerciais disponíveis estão sendo reportados por todo o mundo. A formação de biofilmes potencializa a adesão e persistência destas bactérias em diversos tipos de superfícies, aumentando riscos de contaminação. Biofilmes também fornecem uma barreira física à ação de antimicrobianos e desinfetantes. Estas características culminaram na classificação de *A. baumannii* como o patógeno prioritário ao desenvolvimento de novos antimicrobianos pela Organização Mundial da Saúde. A fluopsina C (FlpC) é um composto organocúprico de baixo peso molecular produzido pelo metabolismo secundário de poucas espécies de *Pseudomonas* e *Streptomyces*, e que apresenta um amplo espectro de atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas multirresistentes. Nesta pesquisa, investigamos a atividade antibiofilme da FlpC em biofilmes de *A. baumannii* extensivamente resistentes aos antimicrobianos (XDR, *extensively drug-resistant*) formados sobre poliestireno, e também, os efeitos de sua combinação com a polimixina B (PoIB) contra células planctônicas. A concentração inibitória mínima (CIM) da FlpC para todos os isolados de *A. baumannii* XDR testados foi de $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Quando combinadas, FlpC e a PoIB, um efeito aditivo foi observado, reduzindo os valores de CIM de ambos os antimicrobianos. Biofilmes estabelecidos foram grandemente afetados pela exposição à FlpC durante 24 h, levando à remoção de 95,25% da biomassa do biofilme com $7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguida por 95,10% com $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, em *A. baumannii* IC 230. Adicionalmente, em $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, observamos redução na viabilidade das células remanescentes, e também a dispersão da matriz do biofilme de IC 230. Os dados obtidos corroboram que a FlpC é um composto promissor com atividades antimicrobiana e antibiofilme contra isolados de *A. baumannii* XDR e pode auxiliar no desenvolvimento de um novo fármaco e formulações desinfetantes, potencializando a remoção de patógenos de superfícies.

Palavras-chave: metabólito secundário; *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV; complexo metálico da tioformina; antimicrobiano organometálico; efeito antibiofilme.

SILVA, Leandro Afonso da. **Effect of fluopsin C on extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii***: antibiofilm activity and interaction with polymyxin B. 2021. 78 p. Master thesis (Master in Microbiology) – Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

The resistance of *Acinetobacter baumannii* to different classes of antimicrobials is increasing rapidly, and isolates resistant to all commercial antibiotics are reported around the world. Biofilm production enhances its adhesion and persistence in many types of surfaces, increasing contamination risks. Moreover, biofilms also provide a physical barrier to the action of antimicrobials and disinfectants. These characteristics culminated in the classification of *A. baumannii* as the priority pathogen of the World Health Organization to development of new antimicrobials. Fluopsin C (FlpC) is an organocupric compound with low-molecular-weight produced by few species of *Pseudomonas* and *Streptomyces* secondary metabolism and presents a broad spectrum of antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including multidrug-resistant strains. In this study, we investigate antibiofilm activity of FlpC in biofilms of extensively drug-resistant (XDR) *A. baumannii* formed on polystyrene, and also the effects of its combination with polymyxin B (PolB) in planktonic cells. The minimum inhibitory concentration (MIC) of FlpC on XDR *A. baumannii* was $3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ for all isolates tested. When combined FlpC with PolB, an additive effect was observed, reducing MIC values to both antibiotics. Established biofilms were highly affected by 24 h FlpC exposure, which has removed 95.25% of the biofilm biomass with $7.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, following by 95.10% with $3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, in *A. baumannii* CI 230. Additionally, in $3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, we observed reductions in the viability of the remaining cells and the dispersion of the biofilm matrix of CI 230. Obtained data enforces that FlpC is a promissory compound with antimicrobial and antibiofilm activity against XDR *A. baumannii* strains, and could help in new drug development and disinfectant formulations, to enhance the removal of pathogens on surfaces.

Key-words: secondary metabolite; *Pseudomonas aeruginosa* LV strain; thioformin metal complex; organometallic antimicrobial; antibiofilm effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cristais de fluopsina C em tubo de ensaio (A) e sua estrutura molecular (B).....	22
Figura 2 – Sistema de cromatografia líquida à vácuo (CLV) para a obtenção de F3. A seta indica a fração que comporta a fluopsina C.	28
Figura 3 – Sistema de cromatografia líquida à vácuo (CLV) para a obtenção de F3d. A seta indica a fração que comporta a fluopsina C	30
Figura 4 – Sistema de cromatografia líquida à vácuo (CLV) para a obtenção de F4A. A seta indica a fração que comporta a fluopsina C.....	32
Figura 5 – Processo geral de formação de biofilmes (bactéria modelo <i>P. aeruginosa</i>).....	44

ARTIGO

Figure 1 – Dark-green thin prismatic crystals of fluopsin C purified from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LV strain supernatant by two sequential flash chromatography processes.....	66
Figure 2 – Purified fluopsin C solids chromatogram at 262 nm wavelength using a C18 (5 µm x 4.6 mm x 250 mm) column washed with a gradient system of acidified ultrapure water (1% v/v acetic acid) to acetonitrile. Fluopsin C molecule was detected at 14.3 min. and indicated a high purity level (90.45%).....	66
Figure 3 – Screening for fluopsin C susceptibility of <i>Acinetobacter baumannii</i> clinical isolates and the reference strain ATCC 19606 by disk diffusion method. The disks on the right were impregnated with 10 µg of fluopsin C in DMSO, and disks on the left were impregnated with 10 µL of DMSO. (A) ATCC 19606; (B) CI 223; (C) CI 224; (D) CI 226; (E) CI 227; (F) CI 230; (G) CI 232.....	67
Figure 4 – Effect of different concentrations of fluopsin C on established biofilms of ATCC 19606 (weak biofilm producer) and the clinical isolates 226 and 230 (moderate biofilm producers) after 24 h of exposure. Capital letters indicate significant differences between treatments in the same bacteria and lowercase letters indicate	

significant differences between the same treatment concentration in different bacteria, both considering $p < 0.05$ as significant in Tukey multiple comparison test.69

Figure 5 – Effect of exposure of *Acinetobacter baumannii* CI 230 24-h biofilm to fluopsin C. Fluorescence microscopy of (A) Biofilm not exposed to fluopsin C (Control) and (B) biofilm exposed to MIC ($3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 24 hours. Biofilm was formed on glass-coverslips and stained with BacLight live/dead bacterial viability kit. Green fluorescent cells (SYTO 9 stain) represent cells without membrane damages, while red fluorescent cells (propidium iodide stain) represent damaged membrane bacterial cells.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microrganismos produtores de fluopsina C	22
Tabela 2 – Principais complexos organometálicos do grupo das fluopsinas (complexos de tioformina). Traços indicam a inexistência de descrições referentes aos respectivos itens.....	23
Tabela 3 – Genes hiperexpressos em cultivo de <i>P. aeruginosa</i> cepa LV na presença de 100 mg/L de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em categorias funcionais e as hipóteses correlacionais à biossíntese de fluopsina C.....	25
Tabela 4 – Resistência intrínseca aos antimicrobianos apresentada por espécies do gênero <i>Acinetobacter</i> , disponibilizadas pelo CLSI e EUCAST	38
Tabela 5 – Categorias de antimicrobianos, e seus respectivos agentes, empregados para a determinação do perfil de resistência no gênero <i>Acinetobacter</i>	40
Tabela 6 – Priorização de patógenos, segundo a OMS, para guiar a descoberta, pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos para o tratamento de infecções por microrganismos resistentes aos antimicrobianos.....	41

ARTIGO

Table 1 – Antimicrobial susceptibility profiles of <i>Acinetobacter baumannii</i> for commercially available antimicrobials and fluopsin C. Antimicrobial effect of fluopsin C was determined through the inhibitory zones (mm) obtained by disk diffusion method ($10 \mu\text{g disk}^{-1}$) and MICs ($\mu\text{g mL}^{-1}$) by broth microdilution method.....	67
Table 2 – Effect of fluopsin C in combination with polymyxin B on planktonic cells of <i>Acinetobacter baumannii</i> clinical isolates. Polymyxin B susceptibility profiles are represented as resistant (R) and sensitive (S).	68
Table 3 – Characterization of biofilm production by <i>Acinetobacter baumannii</i> clinical isolates and the reference strain ATCC 19606 on polystyrene surface. Biofilms were produced over 24 h at 37 °C in	

sterile flat-bottomed 96-well polystyrene plates and stained with 0.1% (w/v) crystal violet aqueous solution. The stain was resolubilized in methanol and measured at 570 nm wavelength68

Table S1 – Numeric values obtained on biofilm removal assays in different concentrations of fluopsin C (24 hours exposal) against the reference strain ATCC 19606 and XDR clinical isolates 226 and 230 of *Acinetobacter baumannii*.....77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	<i>Antimicrobial Peptide</i>
AMR	<i>Antimicrobial Resistance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CC _{50/24 h}	Concentração Citotóxica 50%
CF	Cromatografia <i>Flash</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CLV	Cromatografia Líquida À Vácuo
CRAB	<i>Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii</i>
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
EXPs	Exopolissacarídeos
FD	Fase Diclorometano
FlpC	Fluopsina C
IDC	2-carboxi-2-heptano-indol-2-ona
IRAS	Infeções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LD ₅₀	Dose Letal 50%
LEM	Laboratório de Ecologia Microbiana
LPS	Lipopolissacarídeos
LV	Lesão Velha
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
OAC	<i>Organocopper Antibiotic Compound</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	<i>Phenazine-1-Carboxylic Acid</i>

PCN	<i>Phenazine-1-carboxamide</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDR	<i>Pandrug-resistant</i>
PolB	Polimixina B
QS	<i>Quorum Sensing</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRE	<i>Vancomycin-resistant Enterococcus faecium</i>
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM NATURAL	19
3.2	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> CEPA LV	19
3.3	FLUOPSINA C	21
3.3.1	Biossíntese	23
3.3.2	Atividade Antimicrobiana	27
3.3.2.1	Fração F3	28
3.3.2.2	Fração F3d	29
3.3.2.3	Fração F4A	31
3.3.2.4	Fluopsina C purificada	33
3.3.3	Citotoxicidade	35
3.4	<i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> : AGENTE ETIOLÓGICO DE INFECÇÕES POTENCIALMENTE LETAIS ASSOCIADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE	37
3.4.1	Resistência Antimicrobiana e Opções Terapêuticas	38
3.5	FORMAÇÃO DE BIOFILMES	43
3.5.1	Produtos Naturais com Atividade Antibiofilme em <i>A. baumannii</i>	45
	REFERÊNCIAS	46
	APÊNDICES	56
	APÊNDICE A – Compêndio da sensibilidade <i>in vitro</i> de microrganismos frente à fluopsina C descritos na literatura	57
	APÊNDICE B – Artigo “Fluopsin C promotes biofilm removal and reduces remaining sessile cells viability of XDR <i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i> clinical isolates besides presenting an additive effect with polymyxin B in planktonic cells”	59
	CONCLUSÃO	78

1 1 INTRODUÇÃO

2

3 *Acinetobacter baumannii* é um cocobacilo Gram-negativo, patógeno
4 oportunista, que oferece grandes riscos em nichos hospitalares, nos quais é endêmico
5 e afeta predominantemente pacientes em estado crítico (HARDING; HENNON;
6 FELDMAN, 2018). Seu amplo repertório de resistência intrínseca a antimicrobianos
7 aliado às suas capacidades de permanência em ambientes desfavoráveis por longos
8 períodos; de formar biofilmes em múltiplos tipos de superfícies; e seu rápido
9 desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antimicrobianos (AMR,
10 *antimicrobial resistance*) tornam esta bactéria um dos principais desafios à
11 antibioticoterapia contemporânea e, conseqüentemente, uma das mais ameaçadoras
12 à saúde humana (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; HARDING; HENNON;
13 FELDMAN, 2018; LIN; LAN, 2014; VALENCIA-MARTIN *et al.*, 2019).

14 O aspecto mais alarmante em relação ao tratamento das infecções
15 promovidas por este microrganismo é o crescente número de isolados resistentes aos
16 carbapenêmicos e aos antimicrobianos de última escolha (polimixina B [PolB],
17 colistina e tigeciclina), sendo reportados pelo mundo, isolados resistentes a todos os
18 antimicrobianos comercialmente disponíveis (GEISINGER *et al.*, 2020).

19 A formação de biofilmes é uma das principais fontes de infecções por
20 *A. baumannii*, sendo também um fator de risco à emergência de resistência a
21 antimicrobianos e desinfetantes, visto que este modo de crescimento viabiliza sua
22 sobrevivência em múltiplas superfícies e forma uma barreira física que impede o
23 contato de agentes inibitórios, potencializando sua permanência e disseminação em
24 diferentes ambientes (BARDBARI *et al.*, 2017; GREENE *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2019;
25 RANGEL *et al.*, 2020).

26 No corpo humano, biofilmes são responsáveis por mais de 80% das
27 infecções microbianas (NIH, 2002) e as células sésseis, contidas nestas estruturas,
28 podem apresentar resistência a agentes antimicrobianos na ordem de 10 a 1000 vezes
29 maior, comparativamente às células planctônicas (REFFUVEILLE *et al.*, 2014).

30 Ainda que muito seja conhecido sobre a importância dos biofilmes e
31 como eles funcionam, os antimicrobianos (e suas respectivas terapias), comumente são
32 desenvolvidos baseados em seus efeitos em células planctônicas e podem falhar na
33 erradicação de biofilmes (DAVIES, 2003), acarretando em piores evoluções de quadros
34 clínicos, incluindo óbitos.

1 Neste contexto, diversas pesquisas têm sido realizadas para avaliar
2 possíveis candidatos ao desenvolvimento de novos antimicrobianos, não somente
3 eficazes contra células planctônicas, mas que também considerem biofilmes como
4 estruturas-alvo, sendo os compostos de origem natural uma promissora vertente nesta
5 área de pesquisa (LU *et al.*, 2019; MOHAMED *et al.*, 2018; SELVARAJ *et al.*, 2020;
6 TIWARI *et al.*, 2017; TUTAR *et al.*, 2016). Entretanto, ressaltamos que a grande
7 maioria dos compostos avaliados contra *A. baumannii* são de origem fitoquímica,
8 sendo pouco explorados metabólitos microbianos.

9 Estudos utilizando a cepa LV de *Pseudomonas aeruginosa* têm
10 reportado um alto potencial biotecnológico agregado ao microrganismo devido a
11 produção de diversos compostos bioativos. Entre eles, destaca-se a fluopsina C
12 (FlpC), um antimicrobiano com amplo espectro de ação sobre diversos
13 microrganismos de interesse clínico e agrícola.

14 A FlpC é um metabólito secundário de baixo peso molecular,
15 biossintetizado a partir de mecanismos de biorremediação à níveis intracelulares
16 excessivos de íons cúpricos (GIONCO *et al.*, 2017; PISTORI *et al.*, 2018). Nos últimos
17 17 anos o Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM), da Universidade Estadual de
18 Londrina (UEL), identificou a atividade antimicrobiana da FlpC frente aos patógenos
19 humanos *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase)
20 (KERBAUY *et al.*, 2016), isolados multirresistentes de *A. baumannii* (GIONCO, 2016),
21 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (CARDOZO *et al.*, 2013) e
22 *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE) (NAVARRO *et al.*, 2019).

23 Baseado nos dados experimentais obtidos até o momento, a FlpC é
24 uma promissora candidata para o desenvolvimento de um novo fármaco
25 antimicrobiano. Entretanto, pouco é sabido sobre as propriedades antibiofilme deste
26 composto. Hipotetizamos que a FlpC seja capaz de desempenhar atividade
27 antimicrobiana sobre células planctônicas, e também, biofilmes de *A. baumannii*. Além
28 disso, que sua associação com a PolB pode ser vantajosa contra células planctônicas
29 de fenótipo extensivamente resistente aos antimicrobianos (XDR, *extensively drug-*
30 *resistant*), e resistentes à PolB.

31 Assim, nesta pesquisa, objetivamos avaliar o efeito da FlpC,
32 purificada a partir do sobrenadante de *P. aeruginosa* cepa LV, sobre células sésseis
33 de biofilmes preestabelecidos de isolados clínicos de *A. baumannii* XDR, e sobre as
34 células planctônicas destes isolados, em associação com a PolB.

1 2. OBJETIVOS

2

3 2.1 OBJETIVO GERAL

4

5 Avaliar o efeito da fluopsina C, purificada a partir do sobrenadante de
6 *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV, sobre células sésseis de biofilmes
7 preestabelecidos de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* extensivamente
8 resistentes aos antimicrobianos, e sobre as células planctônicas destes isolados, em
9 associação com a polimixina B.

10

11 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

12

13 1. Caracterizar o perfil de resistência aos antimicrobianos de escolha nos isolados
14 clínicos de *A. baumannii*, por meio dos métodos de disco-difusão e microdiluição em
15 caldo;

16

17 2. Avaliar o efeito da combinação de fluopsina C com o antimicrobiano comercial
18 polimixina B sobre o crescimento de isolados clínicos de *A. baumannii* pelo método
19 checkerboard;

20

21 3. Classificar a capacidade de formação de biofilme pelos isolados clínicos de *A.*
22 *baumannii* utilizando-se a coloração com cristal violeta;

23

24 4. Quantificar a remoção da biomassa de biofilmes estabelecidos pelos isolados
25 clínicos de *A. baumannii* frente a exposição à fluopsina C por meio da coloração com
26 cristal violeta;

27

28 5. Visualizar o efeito da exposição de biofilmes estabelecidos à fluopsina C na
29 viabilidade das células remanescentes pelo método de coloração Live/Dead.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM NATURAL

Produtos naturais oriundos de plantas, animais e microrganismos são exímias fontes de uma extensa gama de compostos bioativos, aplicáveis à geração de produtos e processos biotecnológicos em diversos segmentos industriais (GOKULAN; KHARE; CERNIGLIA, 2014; PATRICK, 2017).

Neste cenário, ressalta-se a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, como o marco que alterou significativamente o futuro da medicina e sua relação com os microrganismos, culminando em novas maneiras de se buscar por bioativos, que até o início do século XX, eram obtidos majoritariamente de vegetais (PHAM *et al.*, 2019; SIDDIQUI *et al.*, 2014).

A partir deste marco, a bioprospecção de microrganismos dos mais diversos ambientes tem se intensificado progressivamente, em busca de metabólitos bioativos aplicáveis à geração de tais produtos e processos. Entre estes metabólitos, destacam-se os agentes antimicrobianos, um grupo de moléculas quimicamente diversas, capazes de inibir o desenvolvimento de outros microrganismos, mecanismo que culmina no sobrepujamento competitivo em relação obtenção de recursos no habitat em que vivem (MADIGAN *et al.*, 2018; PATRICK, 2017).

Entre os microrganismos mais promissores neste âmbito, destaca-se o gênero *Pseudomonas*, cuja ubiquidade, diversidade biossintética, e as facilidades no isolamento e manipulação genética lhe garantem importâncias nos segmentos industrial, agrícola e médico, sendo extensamente estudado como um dos mais promissores agentes de biocontrole devido a produção de diversos tipos de moléculas antimicrobianas (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

3.2 *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV

A cepa LV de *P. aeruginosa* foi isolada de lesões velhas (LV) foliares em laranjeira (*Citrus sinensis* cv. Valencia) acometida pelo cancro cítrico, doença ocasionada por fitopatógenos bacterianos do gênero *Xanthomonas*, na cidade de Astorga (Paraná, Brasil) em 2004 (RAMPAZO, 2004).

Curiosamente, nos pomares onde foi realizada a bioprospecção na

1 qual isolou-se a cepa LV, e outras bactérias antagonistas, soluções de cobre eram
2 utilizadas como uma das medidas para o controle da doença. Assim, objetivando
3 mimetizar as condições ambientais nas quais os microrganismos foram isolados, as
4 técnicas de cultivo realizadas subsequentemente empregaram cloreto de cobre.

5 Estes cultivos, contendo cobre, evidenciaram o potencial antagônico
6 da cepa LV contra *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, o fitopatógeno-alvo do primeiro
7 estudo descrito utilizando a cepa LV como agente de biocontrole (RAMPAZO, 2004).
8 Mais tarde, seria reconhecido que os íons cúpricos são determinantes à produção de
9 um potente antimicrobiano pela bactéria, descrito na próxima sessão.

10 Recentemente, o genoma de *P. aeruginosa* cepa LV foi sequenciado,
11 sendo determinados seu tamanho (6,468,334 pb), seu conteúdo G-C (66,4%), os
12 genes relacionados à biossíntese de metabólitos secundários e os genes associados
13 à resistência adquirida aos antimicrobianos (SIMIONATO *et al.*, 2021).

14 Desde seu isolamento, diversos estudos utilizando a cepa LV de *P.*
15 *aeruginosa* têm reportado um alto potencial biotecnológico agregado ao microrganismo
16 devido à produção de diversos compostos bioativos pelo metabolismo secundário da
17 bactéria, como as fenazinas fenazina-1-ácido carboxílico (PCA, *phenazine-1-carboxylic*
18 *acid*) e fenazina-1-carboxiamida (PCN, *phenazine-1-carboxamide*); a indolin-3-ona
19 (IDC); e a FlpC.

20 As fenazinas são um extenso grupo de moléculas heterocíclicas
21 nitrogenadas compostas por um núcleo de pirazina flanqueada por dois benzenos,
22 ainda, a diversificação de grupos funcionais presentes neste “esqueleto” definem suas
23 propriedades físico-químicas e biológicas (GUTTENBERGER; BLANKENFELDT;
24 BREINBAUER, 2017; PRICE-WHELAN; DIETRICH; NEWMAN, 2006). Compostos
25 deste grupo químico apresentam atividades antimicrobianas, antiparasitária, inseticida,
26 antitumoral, entre outras (GUTTENBERGER; BLANKENFELDT; BREINBAUER, 2017).

27 A atividade antimicrobiana da PCA, produzida a partir da cepa LV, foi
28 definida por nosso grupo contra o fungo *Botrytis cinerea*, e os resultados obtidos
29 indicaram que o composto promoveu a inibição do crescimento micelial e redução da
30 produção de exopolissacarídeos (EXPs), um dos fatores de virulência do fitopatógeno
31 (SIMIONATO *et al.*, 2017). Assim como a PCA, a PCN é explorada pela literatura
32 científica como um promissor agente de controle de fitopatógenos (AFONSO *et al.*, 2020;
33 PENG *et al.*, 2018) e pode estar relacionada à ativação da resistência sistêmica induzida
34 em plantas (MA *et al.*, 2016).

1 A IDC é um composto recentemente identificado por nosso grupo,
2 pertencente à família das indolinonas, e que foi apontada como um potencial agente
3 antitumoral, devido sua capacidade de reduzir a atividade metabólica de células HepG2
4 (hepatocarcinoma humano), suprimindo sua proliferação (BENICIO *et al.*, 2018).

5 6 3.3 FLUOPSINA C

7
8 Entre os bioativos produzidos por *P. aeruginosa* cepa LV, a FlpC
9 destaca-se como um antimicrobiano com amplo espectro de ação sobre diversos
10 microrganismos de interesse clínico e agrícola. Este metabólito também é descrito como
11 um potencial agente antitumoral (HEDMAN *et al.*, 2004; MA *et al.*, 2013; OTSUKA *et al.*,
12 1972).

13 A FlpC é um metabólito secundário de baixo peso molecular
14 (aproximadamente 243,786 g.mol⁻¹) produzido por *Pseudomonas* spp. e *Streptomyces*
15 sp. (EGAWA *et al.*, 1970; OTSUKA *et al.*, 1972; PISTORI *et al.*, 2018). Outras
16 nomenclaturas existentes para o composto são: antibiótico YC 73 (EGAWA *et al.*, 1970),
17 antibiótico B₁ (DEL RIO *et al.*, 1972; MARTINEZ-MOLINA; DEL RIO; OLIVARES, 1976)
18 e composto antibiótico organocúprico (do inglês *organocopper antibiotic compound*,
19 OAC) (BEDOYA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

20 Identificada em 1970 por Egawa e cols., foi descrita primeiramente
21 como “*um antibiótico verde escuro*” isolado do sobrenadante de cultura de *Pseudomonas*
22 MCRL 10107, e, desde sua descoberta, um número restrito de microrganismos foram
23 descritos como produtores deste composto (Tabela 1).

24 Morfologicamente, a FlpC é caracterizada como finos cristais
25 prismáticos de aparência verde-escuros, ou ainda amarronzados, em congregados
26 macroscópicos (Figura 1A) purificados a partir de sobrenadantes de cultivo microbiano
27 (EGAWA *et al.*, 1970; SHIRAHATA *et al.*, 1970).

28

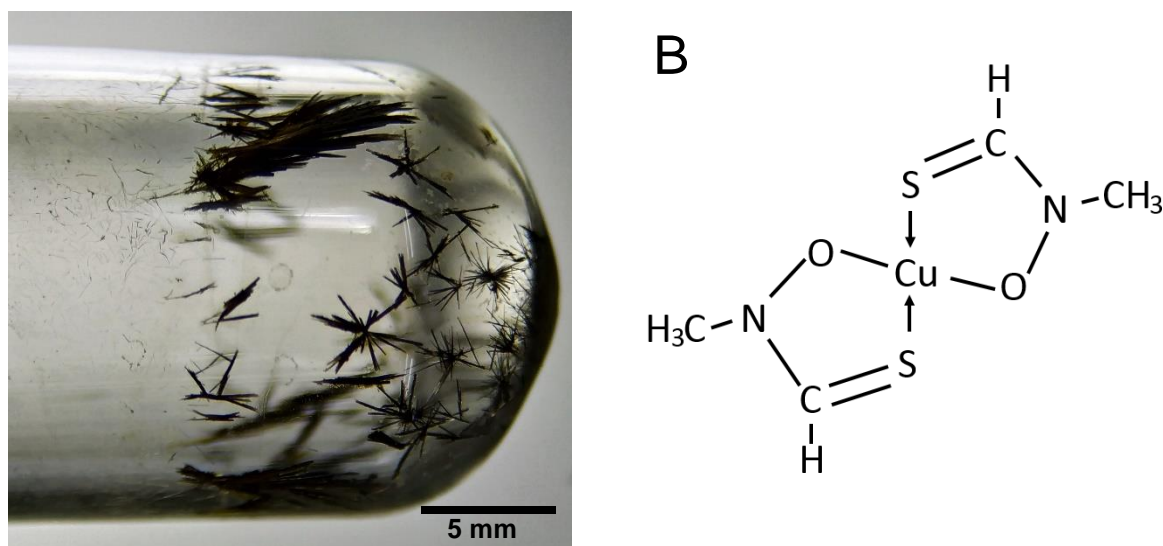
29

1 **Tabela 1 –** Microrganismos produtores de fluopsina C.

Microrganismo produtor	Referência
<i>Pseudomonas</i> MCRL 10107	EGAWA <i>et al.</i> , 1970
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SHIRAHATA <i>et al.</i> , 1970
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KY 4032	ITOH; INUZUKA; SUZUKI, 1970
<i>Pseudomonas reptilivora</i>	DEL RIO <i>et al.</i> , 1972
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3120	KO <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LV	RAMPAZO, 2004
<i>Pseudomonas</i> sp. AV 246 (DSM 15085)	HEDMAN <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas</i> sp. AV 249 (DSM 15086)	HEDMAN <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas jinanensis</i>	MA <i>et al.</i> , 2013
<i>Streptomyces</i> 4601	OTSUKA <i>et al.</i> , 1972

2 **Fonte:** o próprio autor.

3

4 **Figura 1 –** Cristais de fluopsina C em tubo de ensaio (A) e sua estrutura molecular (B).5 **Fonte:** (A) o próprio autor; (B) Adaptado de Ma e cols. (2013).

6

7 A FlpC corresponde quimicamente à bis(*N*-metil-
 8 tioformohidroxamato)cobre(II), molécula originada pela complexação de íons cúpricos
 9 (Cu^{2+}) à duas moléculas de tioformina (ácido *N*-metil-tioformohidroxâmico), um
 10 sideróforo essencial ao sistema de transporte de íons Fe^{3+} através da membrana de
 11 algas, fungos e bactérias (KAKKAR; DUA; GAHLOT, 2007; LEONG; BELL, 1978).

12 Reações de complexação da tioformina ocorrem com diversos íons
 13 metálicos, originando um grupo de compostos denominados de fluopsinas (Tabela 2)
 14 (KAKKAR; DUA; GAHLOT, 2007). Estes complexos organometálicos podem ser obtidos
 15 a partir de biossíntese via metabolismos microbianos, ou ainda, por meio de síntese
 16 química (moléculas análogas) (BELL; FRIEDMAN; LEONG, 1979; ITO *et al.*, 1971;

1 MIYAGISHIMA; YAMAGUCHI; UMINO, 1974; SHIRAHATA; HAYASHI; MATSUBARA,
2 1971).

3

4 **Tabela 2** – Principais complexos organometálicos do grupo das fluopsinas (complexos
5 de tioformina). Traços indicam a inexistência de descrições referentes aos respectivos
6 itens.

Fluopsina	Íon complexo	Morfologia	Referência
F	Fe ³⁺	Cristais prismáticos roxo-escuros	SHIRAHATA <i>et al.</i> , 1970
C	Cu ²⁺	Agulhas verde-escuras	
CA	Ca ²⁺	Agulhas incolores	
N	Ni ²⁺	Agulhas vermelho-escuras	
Z	Zn ²⁺	Cristais prismáticos incolores	EGAWA <i>et al.</i> , 1971
-	Sn ²⁺	Pó marrom-claro	
-	Na ²⁺	Agulhas incolores	
-	Pd ²⁺	Cristais vermelhos	
-	Pt ²⁺	Pasta amarelada	
-	Co ³⁺	Cristais amarronzados	LEONG; BELL, 1978
-	Cr ³⁺	Sólidos esverdeados	
-	Rh ³⁺	-	

7 **Fonte:** o próprio autor.

8

9 3.3.1 Biossíntese

10

11 Até o momento, os processos que culminam na produção de FlpC por
12 células microbianas não foram elucidados, entretanto, nosso grupo tem se dedicado à
13 aplicação de métodos moleculares para determinação destes processos em *P.*
14 *aeruginosa* cepa LV.

15 Sabe-se que a biossíntese de FlpC é dependente da presença de íons
16 cúpricos no cultivo, e análises do transcriptoma de *P. aeruginosa* cepa LV, cultivada na
17 presença e ausência de cloreto de cobre II, indicaram nove genes diferencialmente
18 expressos (hiperexpressos) nos cultivos contendo o metal (GIONCO *et al.*, 2017).

19 A partir de análises *in silico*, verificou-se que entre estes genes, três
20 relacionavam-se à sistemas de efluxo de íons metálicos (PA3521, PA3523 e PA3920);
21 um à chaperona CopZ (PA3574a); um ao regulador transcricional relativo à ativação de
22 sistemas de efluxo responsivo a indutores (PA4878); um relacionado a biossíntese de
23 fenazinas (*phzA2*); e três genes com funções desconhecidas (PA2691, PA4141 e
24 PA4782) (GIONCO *et al.*, 2017).

25 Mais recentemente, Simionato (2020) avaliou a resposta destes genes

1 diferencialmente expressos na presença de cobre temporalmente, agrupando-os em
2 categorias funcionais (Tabela 3) e estabelecendo hipóteses sobre sua relevância na
3 biossíntese da FlpC.

4 O gene *phzA2* está contido em um dos dois operons responsáveis pela
5 biossíntese de fenazinas, especificamente no operon *phz2*, responsável pela produção
6 basal de PCA, que, por sua vez, atua como molécula sinalizadora para autoindução da
7 expressão do operon *phz2* e também para a indução da expressão do operon *phz1*, o
8 que estimula progressivamente a biossíntese de PCA (Li *et al.*, 2011). Baseando-se nas
9 evidências experimentais obtidas, acreditamos que a PCA seja um dos precursores
10 metabólicos da tioformina e, conseqüentemente, da FlpC (SIMIONATO, 2020).

11 A hiperexpressão do gene *phzA2*, e de diversos outros genes
12 relacionados ao transporte de íons metálicos, corroboram a hipótese de que a
13 biossíntese de FlpC é o resultado de um mecanismo de biorremediação da cepa LV a
14 níveis intracelulares excessivos de íons cúpricos (GIONCO *et al.*, 2017; SIMIONATO,
15 2020), uma vez que estes íons exercem grande citotoxicidade mediada pela sua
16 capacidade de romper complexos enzimáticos de núcleo ferro-enxofre e de gerar
17 espécies reativas de oxigênio (EROs) (QUINTANA; NOVOA-APONTE; ARGÜELLO,
18 2017).

19 Ainda não se conhece efetivamente a relação entre a tioformina e os
20 seus potenciais precursores, portanto os processos da biossíntese de FlpC continuam
21 sob investigação e, futuramente, a aplicação de metodologias de silenciamento gênico
22 poderão indicar precisamente os possíveis genes envolvidos neste processo,
23 evidenciando sua relevância sobre a biossíntese do composto alvo.

24

25

- 1 **Tabela 3** - Genes hiperexpressos em cultivo de *P. aeruginosa* cepa LV na presença de 100 mg/L de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em categorias
 2 funcionais e as hipóteses correlacionais à biossíntese de fluopsina C.

Categoria funcional	Gene	Produtos ou processos	Função do produto	Relação com a biossíntese de fluopsina C
Transportadores de metais	<i>PA3574a</i>	Chaperona CopZ	Complexa-se com íons cúpricos citoplasmáticos e induz a expressão de CopA	Em 24 h de cultivo a expressão gênica de <i>PA357a</i> foi 173 vezes maior que o controle. Possivelmente consiste em um dos primeiros mecanismos utilizados para o efluxo de cobre.
	<i>PA3920</i>	Transportador metálico CopA (tipo-P ATPase)	Medeia o transporte de íons cúpricos para o meio extracitoplasmático	Com a produção de FlpC (96 h) a atividade de ambos os genes diminui, uma vez que se diminui a quantidade de íons metálicos livres.
	<i>PA3523</i>	Proteína transmembrana MexP	Componentes do sistema de efluxo MexPQ-OpmE, que atravessa as membranas internas e externas,	Em 24 h de cultivo, o gene <i>PA3523</i> apresenta expressão 53x maior que o controle, não havendo detecção do gene <i>PA3521</i> .
	<i>PA3521</i>	Porina de membrana externa OpmE	promovendo eliminação ativa de cobre	Com a produção de FlpC (96 h) a expressão de ambos os genes aumenta, podendo este mecanismo estar relacionado à extrusão da FlpC para o meio extracelular.
Regulador transcricional	<i>PA4878</i>	Regulador transcricional BrIR	Relacionado à expressão de genes ABC, modificações em lipopolissacarídeos (LPS), na composição da membrana e ativação de genes do sistema de efluxo do tipo Mex	O gene apresentou-se mais expresso em 24 e 96 h, coincidindo com os índices de aumento de expressão aos genes codificantes de MexPQ-OpmE, sendo possivelmente o regulador transcricional destes.
Biossíntese de fenazinas	<i>phzA2</i>	Biossíntese e regulação da	Conversão de ácido corísmico em PCA e regulação da biossíntese de PCA	O gene apresentou maior expressão em 24 h, não às 96 h, quando a FlpC começa a ser produzida. Possivelmente a PCA

		biossíntese de PCA		seja uma molécula precursora para a formação da tioformina, que posteriormente irá se ligar ao cobre formando a FlpC (intracelularmente ou extracelularmente).
Proteínas hipotéticas*	PA2691	Proteína NADH:quinona oxirredutase do tipo II (NDH-2)	Possivelmente reduz efeitos de estresses metabólicos (acúmulo de NADH e EROs)	A expressão do gene foi maior nos tempos de 96 e 168 h, podendo esta proteína estar relacionada às amenizações dos estresses metabólicos e formação de EROs promovidas, principalmente, pela presença de FlpC na célula do microrganismo produtor.
	PA4141	Relacionado a sistemas <i>quorum sensing</i> (QS) regulados pelos ativadores transcricionais <i>las</i> e <i>rhl</i>	Expressão de metabólitos (p. ex. ramnolipídios, elastases, proteases, fosfolipases, lipases, endotoxinas e homeostase de fenazinas)	Pode atuar como regulador da biossíntese de fenazinas, cujo operon é altamente influenciado pelo sistema QS
	PA4782	Proteína com atividade fosfohidrolase	Possivelmente relacionada a sinalizações celulares correlatas a biofilmes, por meio de c-di-GMP	O sistema de regulação em BrIR é responsivo à c-di-GMP. O gene deste sistema (PA4878) possui maiores níveis de expressão que PA4782 em 24 h, entretanto, em 168 h o gene PA4782 encontra-se hiperexpresso em relação à PA4878, podendo existir um mecanismo de regulação entre ambos.

1 *Em relação a tais proteínas, há limitadas informações e pesquisas que explorem suas funções e produtos.

2 **Fonte:** Adaptado de Simionato (2020).

3.3.2 Atividade Antimicrobiana

Uma característica ímpar às fluopsinas é sua atividade antimicrobiana (EGAWA *et al.*, 1971), na qual se destaca a eficácia da FlpC na inibição do crescimento de importantes microrganismos de interesse clínico, incluindo isolados multirresistentes, que infligem significativas ameaças à vida humana, e agrícola, responsáveis por grandes perdas produtivas em culturas de insumos alimentícios.

Nos últimos 17 anos nosso grupo identificou a atividade da FlpC, a partir de compostos semi-purificados ou puros, frente aos:

a) patógenos humanos: *K. pneumoniae* produtoras de KPC (KERBAUY *et al.*, 2016), isolados multirresistentes de *A. baumannii* (GIONCO, 2016), MRSA (CARDOZO *et al.*, 2013) e VRE (NAVARRO *et al.*, 2019);

b) fitopatógenos bacterianos: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (OLIVEIRA *et al.*, 2016), *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (VASCONCELLOS *et al.*, 2014), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (MUNHOZ *et al.*, 2017) e *Candidatus Liberibacter asiaticus* (PISTORI *et al.*, 2018);

c) fitopatógeno fúngico: *Sclerotinia sclerotiorum* (dados não publicados).

Comumente, a FlpC é utilizada estando contida em frações semi-purificadas, obtidas por meio de extração líquido-líquido do sobrenadante de cultivo com solventes orgânicos e, também, por meio da purificação em sistemas cromatográficos, como a cromatografia flash (CF) e a cromatografia líquida à vácuo (CLV).

Nas pesquisas de nosso grupo as principais frações utilizadas são a F3, F3d e F4A. A seguir, serão caracterizadas suas respectivas obtenções a partir do sobrenadante de *P. aeruginosa* cepa LV e seus principais efeitos, a fim de dimensionar a atividade antimicrobiana exercida pela FlpC. Adicionalmente, um compêndio dos microrganismos cuja atividade antimicrobiana do composto já foi descrita encontra-se disposto na Tabela Suplementar 1 (Apêndice A).

1 3.3.2.1 Fração F3

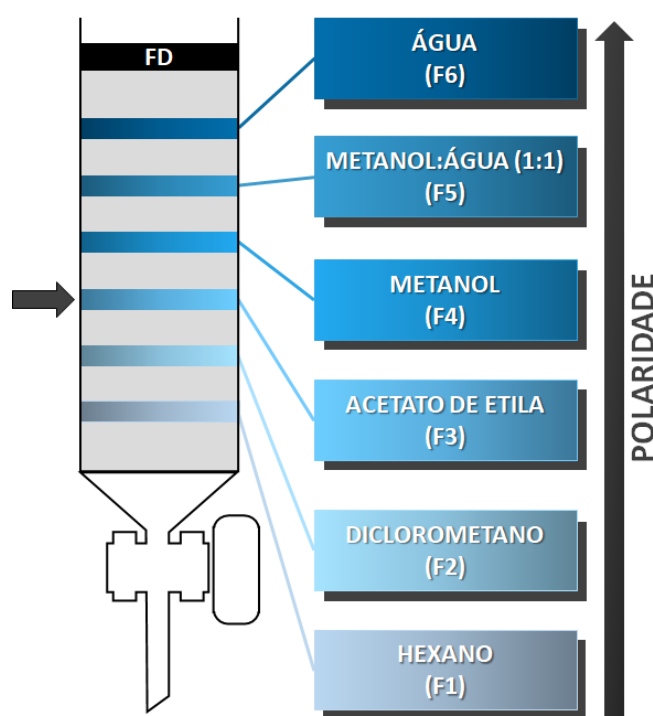
2

3 A partir do sobrenadante concentrado de *P. aeruginosa* cepa LV,
 4 submetido à extração líquido-líquido com diclorometano na proporção 1:2 (v/v) é obtida
 5 a fase diclorometano (FD). A partir da semi-purificação deste extrato por CLV é possível
 6 obter frações que apresentam altos índices de atividade antimicrobiana, com destaque
 7 àquelas que contém a FlpC.

8 Para a obtenção da fração F3, a FD é submetida à CLV, utilizando como
 9 fase móvel um gradiente crescente de polaridade de solventes orgânicos, sendo cada
 10 eluente aplicado no volume de 40 mL por 10 vezes consecutivas sob a fase estacionária
 11 (sílica gel 60), gerando ao final do processo 6 frações, sendo a FlpC contida na fração
 12 F3 (Figura 2) (OLIVEIRA *et al.*, 2016), o que determinou a utilização desta em diversos
 13 estudos de nosso grupo.

14

15 **Figura 2** – Sistema de cromatografia líquida à vácuo (CLV) para a obtenção de F3. A
 16 seta indica a fração que comporta a fluopsina C.



17

Fonte: adaptado de Oliveira e cols. (2016).

18

19 Esta fração demonstrou ser eficiente na inibição do crescimento do
 20 fitopatógeno *X. citri* pv. *citri* (Xanthomonadaceae), cuja concentração inibitória mínima
 21 (CIM) foi igual a 19,53 µg/mL. Nesta concentração a F3 levou à inibição da produção de

1 EXPs em 1 h de tratamento. Após 3-6 h de exposição, foram observadas por microscopia
2 eletrônica de varredura (MEV), pequenas quantidades de EXPs acompanhadas de
3 células morfológicamente encolhidas e granulosas. Adicionalmente, utilizando-se a
4 microscopia eletrônica de transmissão (MET), foram observadas células alongadas com
5 alterações na membrana citoplasmática em 1 h de exposição, evoluindo para
6 indistinções entre a parede celular e a membrana citoplasmática em 3 h de tratamento
7 e, por fim, culminando na lise celular em 6 h de tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2011).
8 Neste mesmo estudo, experimentos *in planta*, utilizando como modelo a laranjeira (*Citrus*
9 *sinensis* cv. Valencia), a aplicação de 10 µg/mL da fração F3 por aspersão, como
10 tratamento preventivo, promoveu redução de cerca de 93,5% na formação de lesões
11 foliares ocasionadas pelo fitopatógeno.

12 A F3 também apresentou efetividade no controle de *X. arboricola* pv.
13 *pruni* (Xanthomonadaceae) *in vitro*, apresentando a CIM de 50 µg/mL
14 (VASCONCELLOS *et al.*, 2014). Com o uso de 200 µg/mL observou-se a redução de
15 EXPs em 1 h de exposição, acompanhada de pequenas alterações morfológicas, que
16 evoluíram para ausência de EXPs e desarranjos nas células bacteriana em 3 h; seguido
17 da observação de depressões na parede celular em 6 h (MEV). No modelo de infecção
18 do pessegueiro (*Prunus persica* cv. Maciel) a fração promoveu a redução de cerca de
19 70% das lesões foliares formadas, a partir do uso de 150 µg/mL em tratamentos
20 curativos e preventivos, sendo elencada como a concentração mais adequada, visto que
21 não houveram diferenças estatísticas significativas entre esta dose e a dose de 450
22 µg/mL, que apresentou efeitos fitotóxicos.

23

24 3.3.2.2 Fração F3d

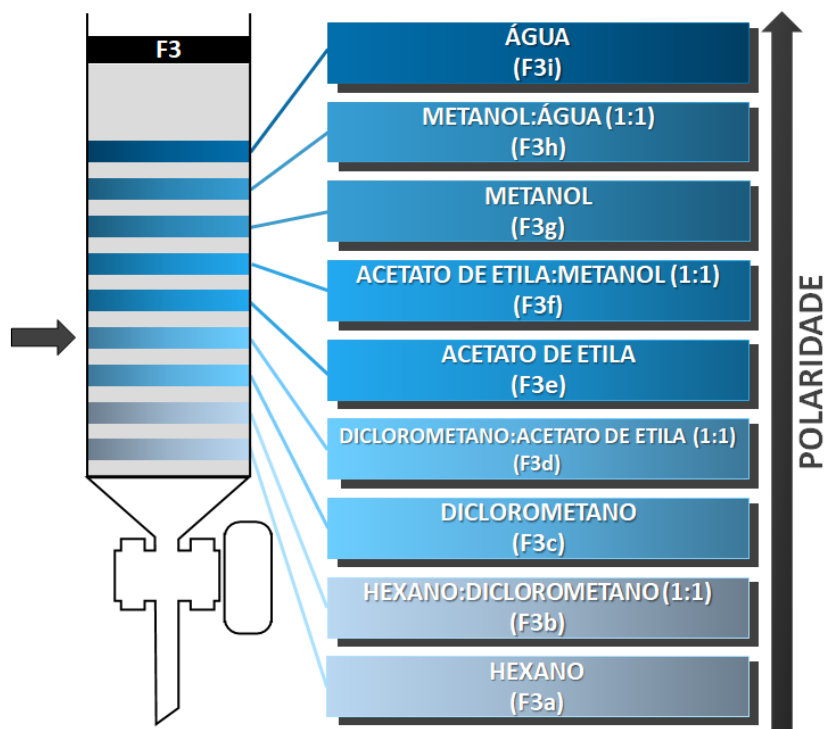
25

26 Uma vez determinado que a fração F3 apresentava altos índices de
27 eficácia na inibição do crescimento de diversos microrganismos, um novo sistema
28 cromatográfico foi desenvolvido, a fim de potencializar a purificação dos compostos
29 presentes na fração.

30 Este novo sistema baseava-se na CLV, em condições operacionais
31 similares ao descrito em 3.3.2.1, adaptando-se a fase móvel, sendo adicionados
32 sistemas intermediários baseados em misturas 1:1 (v/v) dos eluentes adjacentes (Figura
33 3) (OLIVEIRA *et al.*, 2016). A fração F3d apresenta composição média de
34 aproximadamente 30% (massa) de FlpC (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

1
2
3

Figura 3 - Sistema de cromatografia líquida à vácuo (CLV) para a obtenção de F3d. A seta indica a fração que comporta a fluopsina C.



4
5

Fonte: adaptado de Oliveira e cols. (2016).

6
7
8
9
10
11
Gionco (2016) reportou o efeito da fração F3d sobre isolados de *A. baumannii* (Moraxellaceae) produtores de β -lactamases de classe D (oxacilinases), obtendo CIM igual a 7,8 $\mu\text{g/mL}$. Adicionalmente, a fração F3d apresentou efeito sinérgico com a PolB, levando a população de *A. baumannii* produtora da carbapenemase OXA-23 à morte em aproximadamente 14 h de exposição, e prevenindo a seleção de subpopulações resistentes (heteroresistência).

12
13
14
15
16
17
18
19
20
Contra *K. pneumoniae* (Enterobacteriaceae) produtoras de KPC e *K. pneumoniae* ATCC 10031, a F3d resultou na CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e, utilizando a FlpC purificada por CF, verificou-se a CIM de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ no isolado clínico *K. pneumoniae* KPC3, evidenciando que o composto puro apresentou atividade 16x superior à fração semi-purificada (KERBAUY *et al.*, 2016). O uso da fração na CIM, no tempo de exposição de 14 h, levou à eliminação total da população de células planctônicas do isolado KPC3 e redução significativa da viabilidade celular das células aderidas a matrizes de biofilme em 24 h de exposição e, em ambas as condições, extensas alterações morfológicas foram observadas nas células (MEV).

1 Isolados clínicos de VRE (Enterococcaceae) também apresentaram
2 sensibilidade a F3d, resultando na CIM de 31,2 µg/mL em *E. faecium* VRE-15, e de 15,6
3 µg/mL para os demais isolados avaliados e a cepa de referência ATCC 6569 (AMICHI,
4 2015). Quando cultivadas na presença de 15,6 µg/mL da fração, ATCC 6569 e *E.*
5 *faecium* VRE-170 apresentaram declínio progressivo da densidade celular bacteriana,
6 culminando na erradicação da população em 8 h de exposição. Ainda, nas
7 concentrações de 15,6 e 7,8 µg/mL o composto promoveu a redução da formação de
8 biofilmes pelas bactérias em cerca de 80% e 70%, respectivamente. Na concentração
9 de 250 µg/mL, cerca de 50% dos biofilmes pré-estabelecidos foram removidos, em
10 relação aos controles, levando à grande redução da viabilidade celular das células
11 remanescentes.

12 Em cepas de MRSA (Staphylococcaceae) a fração F3d apresentou CIM
13 de 125 µg/mL para *S. aureus* BEC9393 e *S. aureus* N315, tendo esta última, sua curva
14 de viabilidade determinada frente a exposição ao composto na concentração de 200
15 µg/mL durante 24 h, o que resultou na eliminação total das células microbianas, sendo
16 observadas depressões na parede celular bacteriana a partir de 2 h de exposição a 100
17 µg/mL da fração (MEV) (CARDOZO *et al.*, 2013).

18 Oliveira e cols. (2016) propuseram o uso da fração F3d no controle do
19 cancro cítrico (agente etiológico *X. citri* pv. *citri*) em laranjeiras (*C. sinensis* cv. Valencia).
20 Neste estudo, ambos os tratamentos preventivo e curativo apresentaram correlação
21 entre a dose e a quantidade de lesões foliares visualizadas, obtendo redução de 90%
22 das lesões com a utilização de 1 µg/mL de F3d no tratamento preventivo. Após 120 h do
23 tratamento preventivo poucas células do fitopatógeno encontravam-se no mesófilo e as
24 células presentes continham alterações morfológicas e indicativos de lise celular, com
25 reduzida presença de EXPs, enquanto que as células do mesófilo aparentavam-se
26 intactas. Adicionalmente, a atividade do composto manteve-se durante semanas sobre
27 a superfície foliar e dentro das folhas, reduzindo o potencial de contaminação mediante
28 a inoculação do fitopatógeno.

29

30 3.3.2.3 Fração F4A

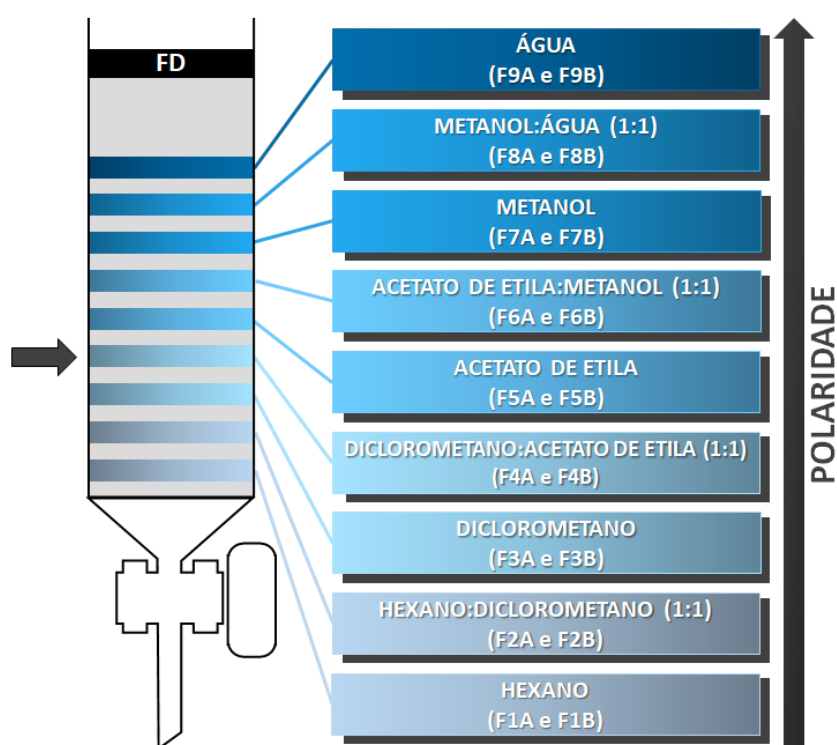
31

32 Outra fração amplamente utilizada por nosso grupo é a F4A, obtida por
33 meio de CLV, nas mesmas condições operacionais as descritas em 3.3.2.2, utilizando-
34 se como amostra para separação a FD (Figura 4). Neste método, é empregado um

1 sistema em gradiente de polaridade dos solventes, idêntico ao aplicado à obtenção da
 2 fração F3d, entretanto o volume dos solventes adicionados à fase estacionária é
 3 separado em alíquotas de 200 mL cada, gerando sub-frações (A e B) em cada etapa do
 4 processo, tendo a F4A uma composição média de 30% de PCA, 25% de FlpC, 25% de
 5 PCN, 5% de IDC e 15% de outros compostos (PISTORI *et al.*, 2018).

6

7 **Figura 4** – Sistema de cromatografia líquida à vácuo (CLV) para a obtenção de F4A. A
 8 seta indica a fração que comporta a fluopsina C.



9

Fonte: Adaptado de Munhoz e cols. (2017)

10

11 Em *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*
 12 (Enterobacteriaceae) a fração F4A apresentou CIM de 7,81 µg/mL, com lise celular após
 13 3 h de exposição, verificada em MEV. No modelo *in planta* de tomateiros (*Solanum*
 14 *lycopersicum* cv. Santa Clara), as plantas tratadas alcançaram percentual de
 15 sobrevivência de 100% utilizando tratamento preventivo de 70 µg/mL da fração e,
 16 adicionalmente, neste tratamento foram obtidas as plantas com o maior crescimento,
 17 produtividade (em gramas) e número de frutos (MUNHOZ *et al.*, 2017).

18

19 Pistori e cols. (2018) avaliaram a efetividade da F4A contra *Candidatus*
 20 *Liberibacter asiaticus* (Rhizobiaceae) em laranjeiras (*C. sinensis* cv. Valencia), sendo a
 presença do microrganismo confirmado por meio da reação em cadeia da polimerase

1 (PCR, *Polymerase Chain Reaction*,) convencional, visto que estas bactérias Gram-
2 negativas não são cultiváveis em culturas axênicas. Os resultados obtidos apontaram
3 que a melhor concentração de F4A para o controle, preventivo e curativo, das plantas
4 nos períodos de aplicação (4 meses) foi de 100 µg/mL, aplicada por meio de aspersão.
5 Ainda, a fração foi indicada como uma potencial elicitadora dos mecanismos de resistência
6 sistêmica adquirida da planta, atividade atribuída a outros componentes da fração,
7 possivelmente as fenazinas PCA e/ou PCN, indicando que os componentes da F4A
8 podem atuar sinergicamente promovendo múltiplas respostas na defesa contra
9 fitopatógenos.

10 11 3.3.2.4 Fluopsina C purificada

12
13 A FlpC com altos níveis de pureza é obtida por meio de CF para a
14 separação dos compostos presentes na FD. O sistema padronizado para sua purificação
15 consiste no uso de sílica gel 60 (0,04-0,062 mm) como fase estacionária e um sistema
16 de fase móvel composto por éter de petróleo: diclorometano: éter etílico em proporção
17 de 65:25:10 (v/v) (NAVARRO *et al.*, 2019).

18 A fim de analisar a resposta microbiana em cultivos contendo FlpC,
19 Navarro e cols. (2019) aplicaram o método de passagens seriais para determinar a perca
20 de sensibilidade ao antimicrobiano, temporalmente, isolando clones resistentes. Neste
21 estudo verificou-se evolução da CIM da FlpC em *K. pneumoniae* ATCC 10031 (de 1
22 µg/mL para 4 µg/mL) e *K. pneumoniae* kpn-KPC 19 (de 2 µg/mL para 16 µg/mL) após
23 21 dias de cultivos seriais na presença do antimicrobiano. Uma resposta similar foi
24 observada em *S. aureus* MRSA N315 (de 0,5 µg/mL para 1 µg/mL) e *E. faecium* VRE-
25 170 (de 1 µg/mL para 2 µg/mL). Adicionalmente, para *S. aureus* MRSA BEC9393 e *E.*
26 *faecium* ATCC 6569 não houveram alterações na CIM, ambas de 1 µg/mL.

27 Entretanto, após submeter os clones resistentes a FlpC em cultivos
28 seriais na ausência do antimicrobiano (10 dias consecutivos), a CIM para o composto
29 diminuiu em todas as cepas avaliadas, não sendo reestabelecidas aos valores originais
30 apenas em *K. pneumoniae* ATCC 10031 (nova CIM = 2,0 µg/mL) e kpn-KPC 19 (nova
31 CIM = 4,0 µg/mL). Este contexto indica a tendência à regressão das CIMs, sendo
32 hipotetizado que as mutações responsáveis pelos mecanismos de defesa desenvolvidos
33 pela célula à FlpC reverterem-se em sua ausência.

1 Ainda neste estudo, foram observadas, em MEV e MET, que culturas
2 de *K. pneumoniae* kpn-KPC 19 e *S. aureus* MRSA N315, tratadas com FlpC por 1 h,
3 apresentaram redução da densidade celular e de presença de matriz extracelular, além
4 de depressões nas células (indicativo de rompimento), alterações citoplasmáticas e
5 vacuolização.

6 Outro estudo demonstrou que os efeitos ultraestruturais promovidos
7 pela FlpC purificada e a fração F4A são similares (NAVARRO *et al.*, 2020). Em *X. citri*
8 subsp. *citri* 306 os autores constataram a disrupção da membrana citoplasmática e
9 presença de células mais enrugadas (MEV), bem como alongamento celular e
10 indistinção entre a membrana citoplasmática e a parede celular (MET). Alterações
11 similares foram observadas em *K. pneumoniae* Kpn-19 e, adicionalmente, alterações no
12 citoplasma da célula foram observados (MET); em *E. faecalis* ATCC 6569 alterações
13 ultraestruturais não foram evidenciadas, entretanto, houve extensiva redução no número
14 de células após o tratamento; em MRSA N315 não foi possível observar a parede celular,
15 e as células apresentaram citoplasma elétron-denso e heterogêneo quando comparadas
16 ao controle. Adicionalmente, a exposição à FlpC durante 15 min. promoveu diversos
17 danos à membrana citoplasmática em todos os microrganismos avaliados no estudo,
18 tornando-as mais permeáveis.

19 A partir dos dados supracitados, atualmente acredita-se que o principal
20 mecanismo de ação da FlpC sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ocorra
21 sobre a membrana citoplasmática, tornando-a mais permeável (NAVARRO *et al.*, 2020).
22 Ainda, um efeito secundário observado no modelo *X. citri* subsp. *citri* 306 foi a ruptura do
23 septo divisional, possivelmente ocasionado devido a alteração do potencial da
24 membrana citoplasmática frente os danos promovidos pela FlpC (NAVARRO *et al.*,
25 2020), potencial, que por sua vez, é essencial para o posicionamento da proteína FtsZ
26 no eixo de divisão da célula, durante o processo de divisão celular (STRAHL; HAMOEN,
27 2010).

28 Simionato (2016) avaliou a atividade da FlpC purificada (denominada
29 como CF4b no estudo) contra microrganismos contaminantes e formadores de biofilme
30 do processo produtivo do etanol, *Lactobacillus fermentum* (Lactobacillaceae) e
31 *Leuconostoc mesenteroides* (Leuconostocaceae). A CIM em ambos microrganismos foi
32 igual 0,12 µg/mL e, quanto à atividade antibiofilme, constatou-se que a exposição ao
33 composto durante 1 h na concentração de 62,5 µg/mL culminou na inibição da formação
34 de biofilme por *L. fermentum* em cerca de 26,51%, enquanto que, com 31,25 µg/mL, o

1 biofilme de *L. mesenteroides* foi reduzido em cerca de 34,93%. Entretanto, até o
2 momento, os mecanismos pelos quais a FlpC promove sua atividade antibiofilme
3 permanecem não elucidados.

4

5 3.3.3 Citotoxicidade

6

7 Com o avanço das pesquisas de caracterização da ação antimicrobiana
8 da FlpC, diversos estudos avaliaram sua citotoxicidade, sendo reportada a concentração
9 citotóxica de 0,195 µg/mL para células HeLa (células de adenocarcinoma cervical
10 humano) (OTSUKA *et al.*, 1972) e baixa citotoxicidade na concentração de 2000 µg/mL
11 de F3d em células LLC-MK2 (células epiteliais do rim de macaco *Rhesus*) uma vez que,
12 nesta concentração, 84% das células avaliadas permaneceram viáveis (KERBAUY *et*
13 *al.*, 2016; CARDOZO *et al.*, 2013; OLIVEIRA, 2016).

14 Mais recentemente, a citotoxicidade da FlpC purificada foi avaliada em
15 células LLC-MK2 e eritrócitos humanos (Navarro *et al.*, 2019). Neste estudo, a
16 concentração citotóxica 50% (CC_{50/24 h}), em ambas as células, foi de aproximadamente
17 2 µg/mL e, abaixo desta concentração, efeitos citotóxicos ou hemolíticos não foram
18 observados.

19 A divergência encontrada entre a citotoxicidade da FlpC purificada e da
20 fração F3d pode ser interpretada sob a perspectiva dos graus de pureza dos compostos
21 avaliados. Na F3d, cerca de 30% da massa corresponde à FlpC (OLIVEIRA, 2016),
22 enquanto que, nos testes utilizando a FlpC purificada, o composto apresentava
23 aproximadamente 80% da massa total (NAVARRO *et al.*, 2019). Portanto, o uso do
24 composto purificado apresentou resultados mais precisos quanto sua toxicidade.

25 No modelo invertebrado larval de *Tenebrio molitor* (Coleoptera:
26 Tenebrionidae), administrações intra-hemocélicas de 0,06 e 0,12 µg de FlpC não
27 afetaram a viabilidade das larvas; entre 0,25 e 0,5 µg taxas de mortalidade de 20 e 42%,
28 respectivamente, foram obtidas; e entre 1 e 2 µg, obteve-se mortalidade total após 96 h
29 de administração, indicando que a melhor condição de tratamento corresponderia a uma
30 dose de aproximadamente 3 mg/kg (NAVARRO *et al.*, 2019).

31 Navarro e cols. (2019) definiram os efeitos tóxicos da FlpC no modelo
32 murino Swiss (*Mus musculus*; Rodentia: Muridae) de infecção peritoneal e,
33 seguidamente, no de bacteremia promovida por *K. pneumoniae* kpn-KPC 19.

34 No modelo de infecção peritoneal, a dose letal 50% (LD₅₀) obtida foi de

1 4 mg/kg sendo que, doses abaixo desta concentração, não promoveram efeitos tóxicos
2 nos animais tratados no intervalo de 96 h; e doses maiores culminaram em letalidade
3 após 48 h de tratamento. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos
4 nas pesquisas pioneiras da FlpC no tema que indicaram LD₅₀ de 4,5 mg/kg (OTSUKA *et*
5 *al.*, 1972) e 3 a 9 mg/kg (ITOH; INUZUKA; SUZUKI, 1970; EGAWA *et al.*, 1970).
6 Adicionalmente, em nenhum tempo avaliado, o composto foi detectado na corrente
7 sanguínea dos animais tratados, indicando uma baixa biodisponibilidade ou ainda a
8 geração de diferentes moléculas após sua metabolização.

9 No modelo de bacteremia, animais tratados com dose única de 2 mg/kg
10 ou dupla de 1 mg/kg/8 h apresentaram 50% e 40% como taxa de sobrevivência após 72
11 h do tratamento; o regime de dose única de 1 mg/kg demonstrou menor sobrevivência,
12 de 25% evoluindo para 17% no período de 48-72 h pós-tratamento; a dose única de 3
13 mg/kg e dupla de 2 mg/kg/8 h levaram à morte de todos os indivíduos tratados em
14 aproximadamente 37 h e 76 h, respectivamente; e, por fim, o controle de infecção levou
15 à morte dos indivíduos em aproximadamente 96 h.

16 Análises histopatológicas dos fígados e rins do tratamento de maior
17 índice de sobrevivência (2 mg/kg) indicaram alterações hepáticas como moderada
18 congestão dos vasos, infiltração inflamatória, hemorragia, vacuolização das células e
19 deslocamento dos núcleos celulares, sem evidências de necrose ou alterações
20 significativas do número de hepatócitos. Nos rins, o córtex renal não se apresentou
21 alterado, nos corpúsculos glomerulares constatou-se leve infiltração inflamatória e
22 sangramentos, as células dos túbulos apresentaram-se vacuolizadas e com
23 centralização do núcleo. Adicionalmente, houveram alterações do número de
24 corpúsculos glomerulares, no espaço de Bowman e nos diâmetros dos túbulos, quando
25 comparadas com os animais controle.

26 Os resultados supracitados não foram suficientes para caracterização
27 da FlpC como agente nefrotóxico, indicando a necessidade de outros estudos para
28 confirmação da ausência deste efeito. Entretanto, o composto foi caracterizado como
29 hepatóxico em nível moderado. Os dados obtidos indicam que a FlpC pode,
30 potencialmente, ser utilizada como uma estratégia alternativa aos antimicrobianos
31 comerciais que também apresentam efeitos tóxicos (NAVARRO *et al.*, 2019), por
32 exemplo, os polipeptídios colistina e polimixina B (severa nefrotoxicidade), utilizados
33 como última escolha no tratamento de bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplos
34 fármacos antimicrobianos (MDR, *Multidrug-resistant*) (ZAVASCKI; NATION, 2017).

1 A toxicidade da FlpC é um dos principais desafios a serem resolvidos
2 atualmente, para que o composto seja efetivamente desenvolvido como um fármaco
3 antimicrobiano. No momento, não existem dados que comparem os efeitos tóxicos *in*
4 *vivo* do composto frente aos “antimicrobianos de última escolha” comercializados, sendo
5 que estas evidências podem ser utilizadas, no futuro, como justificativa ao uso do
6 composto em infecções microbianas com opções terapêuticas esgotadas.

7 Ainda, ressaltamos o número escasso de pesquisas realizadas com a
8 FlpC pelo mundo, possivelmente devido a seu aspecto de toxicidade, que culminou em
9 um baixo desenvolvimento científico e tecnológico acerca do composto.

10 A fim de sobrepujar os efeitos tóxicos da FlpC métodos de
11 encapsulamento têm sido avaliados experimentalmente por nosso grupo e uma
12 alternativa promissora tem sido a nano-encapsulação por lipossomas, que promove
13 alterações na liberação do composto de forma espacial, temporal e sítio dirigida, o que
14 permite, em muitos casos, redução da toxicidade do composto com manutenção ou
15 aumento de sua eficiência (AKBARZADEH *et al.*, 2013).

16 17 3.4 *ACINETOBACTER BAUMANNII*: AGENTE ETIOLÓGICO DE INFECÇÕES POTENCIALMENTE LETAIS 18 ASSOCIADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

19
20 O gênero *Acinetobacter*, pertencente à família Moraxellaceae (filo
21 Gammaproteobacteria), é composto por aproximadamente 82 espécies (LPSN, 2021)
22 de bactérias Gram-negativas, não-fermentadoras de glicose, não fastidiosas, catalase-
23 positivas, oxidase-negativas e que apresentam metabolismo aeróbico (ABBOTT *et al.*,
24 2013; LIN; LAN, 2014).

25 Atualmente a espécie *A. baumannii* é considerada uma das bactérias
26 Gram-negativas patogênicas mais ameaçadoras à saúde humana. Este cocobacilo, é
27 um patógeno oportunista que oferece grandes riscos em ambientes hospitalares onde é
28 endêmico e, predominantemente, afeta pacientes em estado crítico. As infecções
29 relacionadas à assistência à saúde (IRAS) promovidas por esta bactéria ocorrem
30 principalmente em sítios anatomicamente injuriados, sendo correlata à quadros de
31 pneumonia associada à ventilação mecânica, bacteremia associada à cateter venoso
32 central, infecções cutâneas e de tecidos moles, infecções de sítios cirúrgicos e infecções
33 do trato urinário também relacionadas ao cateterismo (HARDING; HENNON;
34 FELDMAN, 2018).

3.4.1 Resistência Antimicrobiana e Opções Terapêuticas

De acordo com o Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST) (2020) e o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) (2020), *A. baumannii*, e outros representantes do gênero, apresentam resistência intrínseca a um grande número de antimicrobianos convencionalmente utilizados (Tabela 4).

Tabela 4 - Resistência intrínseca aos antimicrobianos apresentada por espécies do gênero *Acinetobacter*, disponibilizadas pelo CLSI e EUCAST.

Antimicrobiano	CLSI (2020) (<i>A. baumannii</i> / <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> complex)	EUCAST (2020) (<i>A. baumannii</i> , <i>Acinetobacter pittii</i> , <i>Acinetobacter nosocomialis</i>)
Ampicilina	R	R
Amoxicilina	R	R
Amoxicilina-ácido clavulânico	R	R
Ampicilina-sulbactam		1
Ceftriaxona		R
Cefotaxima		R
Aztreonam	R	R
Ertapenem	R	R
Trimetoprim	R	R
Cloranfenicol	R	
Fosfomicina	R	R
Tetraciclina		R ²
Doxiciclina		R ²

1: *A. baumannii* pode aparentar sensibilidade à combinação, entretanto, atribui-se a atividade ao sulbactam na espécie; 2: O gênero *Acinetobacter* é intrinsecamente resistente à tetraciclina e doxiciclina, mas não a minociclina e tigeciclina.

Adicionalmente a este perfil, estas bactérias se destacam devido ao rápido desenvolvimento de fenótipos MDR, XDR e pan-resistência (PDR) aos antimicrobianos, além de sua alta capacidade de persistir no ambiente, mesmo em condições desfavoráveis, durante longos períodos de tempo, o que potencializa os riscos de disseminação e, conseqüentemente, contaminação pelo patógeno (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

1 Magiorakos e cols. (2011) propuseram uma metodologia de
2 classificação baseado nos perfis de resistência antimicrobiana de bactérias relacionadas
3 às IRAS, considerando categorias de antimicrobianos epidemiologicamente
4 significativas. Na Tabela 5 estão descritos tais categorias de antimicrobianos para
5 *Acinetobacter* spp. Para os autores, os perfis de resistência podem ser classificados em:

6
7 **a) MDR (*multidrug-resistant*):** não sensível a ≥ 1 agentes
8 antimicrobianos em ≥ 3 classes;

9 **b) XDR (*extensively drug-resistant*):** não sensível a ≥ 1 agentes
10 antimicrobianos em todas as classes, exceto ≤ 2 ;

11 **c) PDR (*pandrug-resistant*):** não sensível a todos os agentes
12 antimicrobianos listados.

13
14 Os carbapenêmicos constituem o tratamento de escolha para infecções
15 ocasionadas por cepas MDR de *A. baumannii*, porém com a emergente resistência aos
16 antimicrobianos pertencentes a esta classe, as polimixinas B e E (colistina) e a tigeciclina
17 têm sido utilizadas como antimicrobianos de última escolha (GARNACHO-MONTERO;
18 TIMSIT, 2019). Entretanto, isolados resistentes a estes fármacos têm sido reportados
19 em pesquisas realizadas no Brasil (CASTILHO *et al.*, 2017; ROMANIN *et al.* 2019;
20 ROSSI *et al.*, 2017; TAVARES *et al.*, 2019) e no mundo. Por sua vez, as polimixinas
21 apresentam efeitos nefrotóxicos e existem ambiguidades quanto a eficácia da tigeciclina
22 contra cepas MDR de *A. baumannii*, fatores que combinados, comprometem a resolução
23 da quadros infecciosos (GARNACHO-MONTERO; TIMSIT, 2019).

1 **Tabela 5** - Categorias de antimicrobianos, e seus respectivos agentes, empregados para
 2 a determinação do perfil de resistência no gênero *Acinetobacter*.

Categorias de antimicrobianos	Agente antimicrobiano
Aminoglicosídeos	Gentamicina
	Tobramicina
	Amicacina
	Netilmicina
Carbapenêmicos antipseudomonas	Imipenem
	Meropenem
	Doripenem
Fluoroquinolonas antipseudomonas	Ciprofloxacina
	Levofloxacina
Penicilinas antipseudomonas + inibidores de β -lactamases	Piperacilina-tazobactam
	Ticarcilina-ácido clavulânico
Cefalosporinas de espectro estendido	Cefotaxima
	Ceftriaxona
	Ceftazidima
	Cefepime
Inibidores da via do folato	Trimetoprim-sulfametoxazol
Penicilinas + inibidores de β -lactamases	Ampicilina-sulbactam
Polimixinas	Colistina
	Polimixina B
Tetraciclina	Tetraciclina
	Doxiciclina
	Minociclina

3 **Fonte:** Magiorakos *et al.* (2011).

4

5 De fato, o aspecto mais alarmante em relação a tais infecções remonta
 6 à emergência de isolados resistentes aos antimicrobianos de última escolha, ou ainda,
 7 resistentes a todos os antimicrobianos disponíveis (GEISINGER *et al.*, 2020).

8 Essa limitação nas opções de tratamento, entre outras características,
 9 culminou na indicação das cepas de *A. baumannii* resistentes à carbapenêmicos (CRAB,
 10 *carbapenem-resistant A. baumannii*) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como
 11 o patógeno prioritário para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (Tabela 6)
 12 (WHO, 2017).

13

1 **Tabela 6** - Priorização de patógenos, segundo a OMS, para guiar a descoberta, pesquisa
 2 e desenvolvimento de novos antimicrobianos para o tratamento de infecções por
 3 microrganismos resistentes aos antimicrobianos.

Prioridade	Microrganismo	Resistência
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenêmicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenêmicos
	Enterobacteriaceae	Carbapenêmicos e cefalosporinas de 3ª geração
Alta	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Salmonella</i> spp.	Fluoroquinolonas
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vancomicina e meticilina
	<i>Campylobacter</i> spp.	Fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas de 3ª geração e fluoroquinolonas
Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Não-suscetível à penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella species</i>	Fluoroquinolonas

4 **Fonte:** adaptado de WHO (2017).

5

6 Dados do SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* indicaram que
 7 as taxas de resistência aos carbapenêmicos no complexo *Acinetobacter calcoaceticus*–
 8 *A. baumannii* era igual à 44,7% (imipenem) e 41,0% (meropenem) entre os anos de
 9 1997-2016 na região da América Latina; o programa ainda indicou que a mesma região
 10 foi a segunda maior quanto a frequência de isolados XDR (61,5%) no mesmo período,
 11 sendo inferior somente a Europa (61,5%); e que o Brasil apresentou a maior frequência
 12 de isolados XDR (1,4%) quando comparado a outros países da América Latina (GALES
 13 *et al.*, 2019).

14 Um estudo de ordem global indicou que dentre as bactérias Gram-
 15 negativas isoladas em diversas regiões do mundo *A. baumannii* foi a espécie que mais
 16 apresentou fenótipos MDR (44,3%), obtendo os maiores índices de isolamento do
 17 fenótipo na América Latina (70,5%), seguido do Oriente Médio (69,5%), África (61,2%),
 18 região Ásia-Pacífico (48,5%) e por fim, América do Norte (30,8%) (GIAMMANCO *et al.*,
 19 2017). A ocorrência deste fenótipo para a espécie também se apresentou muito superior
 20 as outras bactérias Gram-negativas avaliadas, sendo o segundo maior índice global
 21 conferido à *P. aeruginosa* com 12,1% (quase 4 vezes menor). Adicionalmente, os
 22 autores também mostraram a dinâmica global-temporal na taxa de multirresistência
 23 desta espécie, que evoluiu de 23 à 63% de 2004 à 2014 (período de estudo).

1 No Brasil, diversos estudos têm sido realizados para caracterizar a
2 presença de *A. baumannii* em ambientes hospitalares, bem como seus perfis e principais
3 mecanismos de resistência. De acordo com Romanin *et al.* (2019), 78,6% dos isolados
4 de amostras sanguíneas de pacientes internados em um hospital terciário de Londrina
5 (PR-Brasil) entre 2006-2016 foram caracterizados como XDR, enquanto 21,4% como
6 MDR. Neste estudo, 81,6% dos pacientes infectados foram à óbito. Isolados com
7 resistência a imipenem e meropenem (ambos 92,2%), polimixina B e colistina (ambos
8 10,7%) e a tigeciclina (3,9%) também foram reportados.

9 Um outro estudo brasileiro realizado em Goiânia (GO-Brasil) apresentou
10 resultados semelhantes, a partir de isolados de pacientes hospitalizados em unidades
11 de terapia intensiva (UTIs), obtendo taxas de MDR igual a 91,1% e de 7,14% para o
12 fenótipo XDR (CASTILHO *et al.*, 2017). Adicionalmente, em quadros clínicos de
13 bacteremia no estado de São Paulo (SP-Brasil) ocasionados por CRAB, no período de
14 2008-2014, foi constada a prevalência de isolados XDR (60,7%) frente aos MDR (39,3%)
15 (TAVARES *et al.*, 2019).

16 No contexto atual de pandemia da síndrome respiratória aguda grave
17 promovida pelo coronavírus SARS-CoV-2 (agente etiológico da COVID-19), ressalta-se
18 que infecções bacterianas secundárias do trato respiratório inferior ocasionadas por
19 CRAB têm apresentado a maior prevalência comparativamente à outros patógenos
20 microbianos, possivelmente devido ao aumento das internações de longo-termo e ampla
21 utilização de medidas de ventilação mecânica, entre outros fatores, culminando em altas
22 taxas de mortalidade (LI *et al.*, 2020; SHARIFIPOUR *et al.*, 2020).

23 Uma das abordagens para o controle de infecções em ambientes
24 hospitalares é a implementação de protocolos de higiene, de instruções aos profissionais
25 de saúde, de isolamento de pacientes infectados, de usos adequados de
26 antimicrobianos, bem como a vigilância sobre os padrões de sensibilidade aos
27 antimicrobianos (ROMANIN *et al.*, 2019). Entretanto, embora tais abordagens sejam
28 extensamente aplicadas, sua eficácia é relativamente baixa, como demonstrado pelo
29 acréscimo temporal no isolamento de cepas resistentes, sendo reportados casos onde
30 os isolados apresentam resistência a todos os antimicrobianos comerciais utilizados
31 (GEISINGER *et al.*, 2020).

32 Neste contexto, ressaltamos o papel da formação de biofilmes como um
33 dos principais fatores relacionados ao risco de contaminação por *A. baumannii*, e
34 também à resistência aos antimicrobianos e desinfetantes, visto que a formação destes

1 biofilmes promove a adesão microbiana em múltiplas superfícies e potencializam sua
2 sobrevivência nestas, especialmente devido a formação de uma barreira física que
3 impede o contato de agentes inibitórios (BARDBARI *et al.*, 2017; GREENE *et al.*, 2016;
4 RANGEL *et al.*, 2020), bem como a sua patogenicidade (PENESYAN *et al.*, 2019).

5

6 3.5 FORMAÇÃO DE BIOFILMES

7

8 Biofilmes são comunidades (ou populações) dinâmicas de
9 microrganismos que se encontram aderidos uns aos outros, a determinadas superfícies
10 (bióticas ou abióticas), ou interfaces, e que são envoltos por uma complexa matriz
11 composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS, *extracellular polymeric*
12 *substances*) (COSTERTON *et al.*, 1995; HALL-STOODLEY; COSTERTON;
13 STOODLEY, 2004; STEPANOVIĆ *et al.*, 2007).

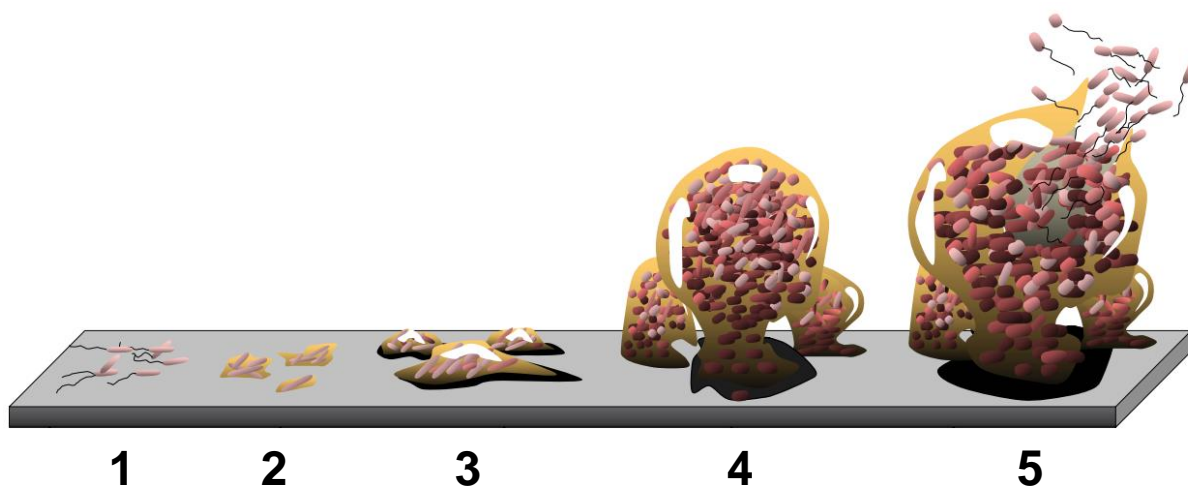
14 Neste modo de crescimento microbiano, a atividade metabólica das
15 células sésseis é altamente integrada e fenótipos distintos em relação às células
16 planctônicas podem ser constatados (GREENE *et al.*, 2016). As células sésseis
17 organizam-se em microcolônias, encapsuladas por sua respectiva matriz, e que são
18 separadas por canais aquosos que promovem o transporte de nutrientes e a remoção
19 de resíduos metabólicos (DAVIES, 2003).

20 De acordo com os *US National Institutes of Health* (NIH, 2002) biofilmes
21 são responsáveis por mais de 80% das infecções microbianas no corpo humano. Ainda,
22 células contidas em biofilmes podem apresentar maior AMR, na ordem de 10 à 1000
23 vezes (REFFUVEILLE *et al.*, 2014).

24 O processo geral de formação de biofilmes está representado na Figura
25 5. Inicialmente, células planctônicas precisam estabelecer contato com determinada
26 superfície e serem capazes de promover a adesão inicial (1); seguidamente, as células
27 iniciam a produção das EPS (matriz do biofilme) e passam pelo processo de divisão
28 celular, neste processo se considera o tipo de adesão como irreversível (2); durante o
29 processo de maturação o aumento da densidade celular ativa o sistema QS (sistema de
30 comunicação célula-célula que sincroniza a expressão gênica bacteriana em resposta a
31 acumulação de moléculas sinalizadoras específicas), promovendo a modulação de
32 estratégias de sobrevivência no biofilme (3 e 4); o sistema QS determina o
33 desenvolvimento do biofilme e, eventualmente, sua ruptura, liberando células que podem
34 reiniciar o ciclo (5) (FERRIOL-GONZÁLEZ; DOMINGO-CALAP, 2020; MONROE, 2007).

1
2
3

Figura 5 - Processo geral de formação de biofilmes (bactéria modelo *P. aeruginosa*).



4 **Fonte:** Adaptado de Monroe (2007).

5

6

7 Devido a capacidade de *A. baumannii* formar biofilmes em múltiplos
8 tipos de superfície, os dispositivos utilizados durante a assistência à saúde são uma
9 recorrente fonte de infecção como, por exemplo, cateteres urinários e de linhas centrais,
10 drenos cirúrgicos, equipamentos de ventilação, linhas de emissão de água e
11 equipamentos de limpeza (GREENE *et al.*, 2016). Superfícies bióticas como a pele,
12 pulmões, corações, rins e outros órgãos também são suscetíveis a abrigar biofilmes do
13 patógeno (RANGEL *et al.*, 2020).

14

15

16 Terapias antimicrobianas, e mesmo os próprios antimicrobianos, são
17 comumente desenvolvidos baseados em seus efeitos em células planctônicas e podem
18 falhar na erradicação de biofilmes, acarretando em quadros clínicos de infecções
19 crônicas e necessidade de remoção cirúrgica das áreas acometidas (DAVIES, 2003).

20

21

22 A formação biofilmes microbianos, pode ser considerada um dos
23 principais fatores que contribuem à emergência da AMR e, devido a ocorrência de
24 eventos de transferência horizontal de genes, um grande número de pesquisas voltadas
25 à busca e caracterização de produtos naturais com atividades antimicrobiana e
antibiofilme têm sido realizadas (Lu *et al.*, 2019), objetivando elencar os mais
promissores compostos para o desenvolvimento de novos antimicrobianos.

23

24

25

3.5.1 Produtos Naturais com Atividade Antibiofilme em *A. baumannii*

Em geral, as principais abordagens utilizadas para a inibição da formação de biofilmes, ou remoção de biofilmes já estabelecidos, consistem em (1) alterar as características físico-químicas da superfície, interferindo na adesão microbiana; ou ainda, pré-condicionar com agentes químicos (p. ex. surfactantes); (2) inibir a colonização e maturação do biofilme utilizando moléculas que suprimem a expressão de fatores relacionados à adesão; (3) utilizar inibidores da biossíntese das matrizes; (4) antagonistas de sinais do QR; (5) ou agentes que inviabilizem as células sésseis (LI; LEE, 2017).

Compostos naturais têm sido avaliados em triagens para detecção de atividade antibiofilme contra *A. baumannii*, incluindo CRAB. Estes compostos são frequentemente oriundos de vegetais, como o mirtenol (monoterpeno bicíclico derivado de *Myrtus communis* e outras espécies) (SELVARAJ *et al.*, 2020); o extrato metanólico de *Actinidia deliciosa* (composto por moléculas fenólicas, flavonoides e alcaloides) (TIWARI *et al.*, 2017); óleo essencial de *Mentha pulegium* L (TUTAR *et al.*, 2016); e cinamaldeído (derivado de óleos essenciais de canela) (MOHAMED *et al.*, 2018).

A melitina, um peptídeo antimicrobiano (AMP, *Antimicrobial peptide*) componente majoritário do veneno da abelha-europeia (*Apis mellifera*) (RANGEL, 2020), apresentou atividade antibiofilme sinérgica com imipenem e colistina em isolados MDR fortes produtores de biofilme, erradicando essa comunidade com a utilização da combinação melitina-colistina (BARDBARI *et al.*, 2018). Entretanto, outro estudo demonstrou que a melitina é ineficaz contra células planctônicas e sésseis de isolados PDR (RANGEL *et al.*, 2020). Magainin 2, um outro AMP, que pode ser isolado a partir da pele de sapos, promoveu a remoção de 66,2% do biofilme de isolados resistentes da bactéria, na concentração de 256 μ M (KIM *et al.*, 2018). Atualmente, estratégias envolvendo fagoterapia também encontram-se em avaliação em biofilmes de CRAB (VUKOTIC *et al.*, 2020).

Propriedades antibiofilme de metabólitos de origem microbiana contra *A. baumannii* têm sido pouco explorados, e menos ainda é sabido sobre o efeito da FlpC nestas estruturas. Neste sentido, a seção experimental desta pesquisa se propõe a avaliar o efeito deste metabólito secundário produzido por *P. aeruginosa* cepa LV frente ao biofilme de isolados clínicos XDR de *A. baumannii*, a fim de superar esta lacuna.

1

REFERÊNCIAS

- 2 ABBOTT, I.; CERQUEIRA, G. M.; BHUIYAN, S.; PELEG, A. Y. Carbapenem
3 resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights
4 and therapeutic strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 4, p.
5 395-409, abr. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1586/eri.13.21>
- 6 AFONSO, L.; GIONCO-CANO, B.; SIMIONATO, A. S.; NIEKAWA, E. T. G.; PEGA, G.
7 E. A.; TAIRA, L. A.; DEALIS, M. L.; ANDREATA, M. F. L.; CHRYSSEAFIDIS, A. L.;
8 ANDRADE, G. Microbial bioactive compound in plant disease management. In:
9 KUMAR, A.; DROBY, S. **Food Security and Plant Disease Management**. Elsevier,
10 2020. p. 37-91. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821843-3.00013-1>
- 11 AKBARZADEH, A.; REZAEI-SADABADY, R.; DAVARAN, S.; JOO, S. W.; ZARGHAMI,
12 N.; HANIFEHPOUR, Y.; SAMIEI, M.; KOUHI, M.; NEJATI-KOSHKI, K. Liposome:
13 classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 102,
14 fev. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- 15 AMICHI, D. P. **Atividade antibiótica de metabólito secundário produzido por**
16 ***Pseudomonas aeruginosa* em células planctônicas e biofilme de *Enterococcus***
17 ***faecium***. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de
18 Londrina, Londrina, 2015.
- 19 BARDBARI, A. M.; ARABESTANI, M. R.; KARAMI, M.; KERAMAT, F.; AGHAZADEH,
20 H.; ALIKHANI, M. Y.; BAGHERI, K. P. Highly synergistic activity of melittin with
21 imipenem and colistin in biofilm inhibition against multidrug-resistant strong biofilm
22 producer strains of *Acinetobacter baumannii*. **European Journal of Clinical**
23 **Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 3 p. 443-454, mar. 2018. DOI:
24 <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3189-7>
- 25 BEDOYA, J. C.; DEALIS, M. L.; SILVA, C. S.; NIEKAWA, E. T. G.; NAVARRO, M. O. P.;
26 SIMIONATO, A. S.; MODOLON, F.; CHRYSSEAFIDIS, A. L.; ANDRADE, G. Enhanced
27 production of target bioactive metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV
28 strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 653–664, jan. 2019. DOI:
29 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.024>
- 30 BELL, S. J.; FRIEDMAN, S. A.; LEONG, J. Antibiotic action of N-
31 methylthioformohydroxamate metal complexes. **Antimicrobial Agents and**
32 **Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 384-391, mar. 1979. DOI:
33 <https://dx.doi.org/10.1128%2Faac.15.3.384>
- 34 BENICIO, L. M.; SIMIONATO, A. S.; NOVELLO, C. R.; GUIMARÃES, J. R.;
35 FELICIDADE, I.; OLIVEIRA, A. G.; MELLO, J. C. P.; MANTOVANI, M. R.;
36 CHRYSSEAFIDIS, A. L.; ANDRADE, G.; COLUS, I. M. S.; OLIVEIRA, M. T. RNAm
37 expression profile of cancer marker genes in HepG2 cells treated with different
38 concentrations of a new indolin-3-one from *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific**
39 **Reports**, v. 8, n. 12781, ago. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30893-w>
- 40 CARDOZO, V. F.; OLIVEIRA, A. G.; NISHIO, E. K.; PERUGINI, M. R. E.; ANDRADE, C.
41 G. T. J.; SILVEIRA, W. D.; DURÁN, N.; ANDRADE, G.; KOBAYASHI, R. K. T.;

- 1 NAKAZATO, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a
2 *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)
3 strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 12, jun. 2013.
4 DOI: <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-12>
- 5 CASTILHO, S. R. A.; GODOY, C. S. M.; GUILARDE, A. O.; CARDOSO, J. L.; ANDRÉ,
6 M. C. P.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A. *Acinetobacter baumannii* strains
7 isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: molecular and drug
8 susceptibility profiles. **PLOS ONE**, v. 12, n. 15., mai. 2017. DOI:
9 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176790>
- 10 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **M100 document: performance**
11 **standards for antimicrobial susceptibility testing, 30th ed.** 2020. Disponível em:
12 <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED30:2020&xo>
13 [rmat=SPDF&src=BB](http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED30:2020&xo). Acesso em: dez. 2020.
- 14 COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.;
15 LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p.
16 711-745, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- 17 DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews**
18 **Drug Discovery**, v. 2, p. 114-122, fev. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- 19 DEL RIO, L. A.; GORGÉ, J. L.; OLIVARES, J.; MAYOR, F. Antibiotics from *Pseudomonas*
20 *reptilivora*. II. Isolation, purification, and properties. **Antimicrobial Agents and**
21 **Chemotherapy**, v. 2, n. 3, p. 189-194, set. 1972. DOI:
22 <https://dx.doi.org/10.1128%2Faac.2.3.189>
- 23 DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals:
24 multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p.
25 939–951, dez. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>
- 26 EGAWA, Y.; UMINO, K.; AWATAGUCHI, S.; KAWANO, Y.; OKUDA, T. Antibiotic YC 73
27 of *Pseudomonas* origin. I. Production, isolation and properties. **The Journal of**
28 **Antibiotics**, v. 23, n. 6, p. 267-270, jun. 1970. DOI:
29 <https://doi.org/10.7164/antibiotics.23.267>
- 30 EGAWA, Y.; UMINO, K.; ITO, Y.; OKUDA, T. Antibiotic YC 73 of *Pseudomonas* origin. II.
31 Structure and synthesis of thioformin and its cupric complex (YC 73). **The Journal of**
32 **Antibiotics**, v. 24, n. 2, p. 124-130, fev. 1971. DOI:
33 <https://doi.org/10.7164/antibiotics.24.124>
- 34 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). **Intrinsic**
35 **resistance and unusual phenotypes.** 2020. Disponível em:
36 https://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/. Acesso em: nov 2020.
- 37 FERRIOL-GONZÁLEZ, C.; DOMINGO-CALAP, P. Phages for biofilm removal.
38 **Antibiotics**, v. 9, n. 5, mai. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050268>
- 39 GALES, A. C.; SEIFERT, H.; GUR, D.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N.; SADER,
40 H. S. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter*
41 *baumannii* complex and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates: results from

- 1 the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2016). **Open Forum**
2 **Infectious Diseases**, v. 6, n. Supplement_1, p. S34-S46, mar. 2019. DOI:
3 <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy293>
- 4 GARNACHO-MONTERO, J.; TIMSIT, J. F. Managing *Acinetobacter baumannii*
5 infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 32, p. 69-76, fev. 2019. DOI:
6 <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000518>
- 7 GEISINGER, E.; MORTMAN, J.; DAI, Y.; COKOL, M.; SYAL, S.; FARINHA, A.;
8 FISHER, D. G.; TANG, A. Y.; LAZINSKI, D. W.; WOOD, S.; ANTHONY, J.; OPIJNEN,
9 T. V.; ISBERG, R. R. Antibiotic susceptibility signatures identify potential antimicrobial
10 targets in the *Acinetobacter baumannii* cell envelope. **Nature Communications**, v. 11,
11 n. 4522, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18301-2>
- 12 GIAMMANCO, A.; CALÀ, C.; FASCIANA, T.; DOWZICKY, M. J. Global assessment of
13 the activity of tigecycline against multidrug-resistant Gram-negative pathogens
14 between 2004 and 2014 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial.
15 **mSphere**, v. 2, jan./fev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00310-16>
- 16 GIONCO, B. ***Pseudomonas aeruginosa* cepa LV produtora de um antibiótico**
17 **organometálico: análise do transcriptoma na presença de cobre e atividade**
18 **antibacteriana em isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes**. 2016.
19 Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina,
20 2016.
- 21 GIONCO, B.; TAVARES, E. R.; OLIVEIRA, A. G.; YAMADA-OGATTA, S. F.; CARMO,
22 A. O.; PEREIRA, U. P.; CHIDEROLI, R. T.; SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O. P.;
23 CHRYSSAFIDIS, A. L.; ANDRADE, G. New insights about antibiotic production by
24 *Pseudomonas aeruginosa*: a gene expression analysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n.
25 66, set. 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389/fchem.2017.00066>
- 26 GOKULAN, K.; KHARE, S.; CERNIGLIA, C. Metabolic pathways: production of
27 secondary metabolites of bacteria. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (eds.).
28 **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed. Cambridge: Academic Press, 2014. p.
29 561–569.
- 30 GREENE, C.; WU, J.; RICKARD, A. H.; XI, C. Evaluation of the ability of *Acinetobacter*
31 *baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. *Letters in Applied*
32 *Microbiology*, v. 63, n. 4, p. 233-239, ago. 2016. DOI:
33 <https://dx.doi.org/10.1111/flam.12627>
- 34 GUTTENBERGER, N.; BLANKENFELDT, W.; BREINBAUER, R. Recent
35 developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of
36 phenazine natural products. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 22, p.
37 6149–6166, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.01.002>
- 38 HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from
39 the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2,
40 p. 95-108, fev. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- 41 HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of
42 *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, p. 91-102,

- 1 fev. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>
- 2 HEDMAN, R.; LEVENFORS, J.; STANISLAW, P.; WELCH, C. F.; DAUGHERTY, S.;
3 LARSSON, R. L.; GULLBO, J.; GERHARDSON, B. **Use of a known substance for the**
4 **treatment of cancer and bacterial and fungal infections (Patent WO2004050095A1).**
5 2004. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/WO2004078179A1/en>>.
6 Acesso em: 21 nov. 2020.
- 7 ITO, Y.; UMINO, K.; SEKIGUCHI, T.; MIYAGISHIMA, T.; EGAWA, Y. Antibiotic YC 73 of
8 *Pseudomonas* origin. III Synthesis of thioformin analogues. **The Journal of Antibiotics**,
9 v. 24, n. 2, p. 131-134, fev. 1971. DOI: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.24.131>
- 10 ITOH, S.; INUZUKA, K.; SUZUKI, T. New antibiotics produced by bacteria grown on n-
11 paraffin (mixture of C₁₂, C₁₃ and C₁₄ fractions). **The Journal of Antibiotics**, v. 23, n. 11,
12 p. 542-545, nov. 1970. DOI: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.23.542>
- 13 KAKKAR, R.; DUA, A.; GAHLOT, P. Metal ion complexes of thioformin: a density
14 functional study. **Polyhedron**, v. 26, p. 5301-5308, set. 2007. DOI:
15 <https://doi.org/10.1016/j.poly.2007.07.049>
- 16 KERBAUY, G.; VIVAN, A. C. P.; SIMÕES, G. C.; SIMIONATO, A. S.; PELISSON, M.;
17 VESPERO, E. C.; COSTA, S. F.; ANDRADE, C. G. T. J.; BARBIERI, D. M.; MELLO, J.
18 C. P.; MOREY, A. T.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.; OLIVEIRA, A. G.;
19 ANDRADE, G. Effect of a metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on
20 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. **Current**
21 **Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 4, fev. 2016. DOI:
22 <https://doi.org/10.2174/138920101704160215171649>
- 23 KIM, M. K.; KANG, N. H.; KO, S. J.; PARK, J.; PARK, E.; SHIN, D. W.; KIM, S. H.;
24 LEE, S. A.; LEE, J. I.; LEE, S. H.; HA, E. G.; JEON, S. H.; PARK, Y. Antibacterial and
25 antibiofilm activity and mode of action of magainin 2 against drug-resistant
26 *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10,
27 out. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19103041>
- 28 KO, H. R.; CHUN, H. K.; KHO, Y. H.; SUNG, N. K. Production, isolation and
29 characterization of the antibiotic from *Pseudomonas aeruginosa* 3120. **Journal of**
30 **Korean Agricultural and Chemical Society**, v. 36, n. 6, p. 428-433, dez. 1993.
31 Disponível em: <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO199303042965074.page>.
32 Acesso em: jan. 2021.
- 33 LEONG, J.; BELL, S.J. Coordination isomers of antibiotic thiohydroxamate-metal
34 complexes. Geometrical isomers of tris(N-methylthioformohydroxamato)rhodium(III) and
35 bis(N-methylthioformohydroxamato)platinum(II). **Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 7, p.
36 1886-1892, jul. 1978. DOI: <https://doi.org/10.1021/ic50185a038>
- 37 LI, J.; WANG, J.; YANG, Y.; CAI, P.; CAO, J.; CAI, X.; ZHANG, Y. Etiology and
38 antimicrobial resistance of secondary bacterial infections in patients hospitalized with
39 COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective analysis. **Antimicrobial Resistance and**
40 **Infection Control**, v. 9, n. 153, set. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00819-1>
41
- 42 LI, X. H.; LEE, J. H. Antibiofilm agents: a new perspective for antimicrobial strategy.

- 1 **Journal of Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 753-766, out. 2017. DOI:
2 <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7274-x>
- 3 LI, Y.; DU, X.; LU, Z. J.; WU, D.; ZHAO, Y.; REN, B.; HUANG, J.; HUANG, X.; XU, Y.;
4 XU, Y. Regulatory feedback loop of two *phz* gene clusters through 59-untranslated
5 regions in *Pseudomonas* sp. M18. **PLoS One**, v. 6, n. 4, abr. 2011. DOI:
6 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019413>
- 7 LIN, M. F.; LAN, C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench
8 to bedside. **World Journal of Clinical Cases**, v. 2, n. 12, p. 787-814, dez. 2014. DOI:
9 <https://doi.org/10.12998/wjcc.v2.i12.787>
- 10 List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN). **Genus**
11 **Acinetobacter**. Disponível em: <https://www.bacterio.net/genus/acinetobacter>. Acesso
12 em: abr. 2021.
- 13 LU, L.; HU, W.; TIAN, Z.; YUAN, D.; YI, G.; ZHOU, Y.; CHENG, Q.; ZHU, J.; LI, M.
14 Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine*, v. 14,
15 n. 11, mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13020-019-0232-2>
- 16 MA, L.; JIANG, C.; CUI, M.; LU, R.; LIU, S.; ZHENG, B.; LI, L.; LI, X. Fluopsin C induces
17 oncosis of human breast adenocarcinoma cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n.
18 8, p. 1093–1100, mai. 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.1038%2Faps.2013.44>
- 19 MA, Z.; HUA, G. K. H.; ONGENA, M.; HÖFTE, M. Role of phenazines and cyclic
20 lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a in induced systemic resistance
21 on rice and bean. **Environmental Microbiology Reports**, v. 8, n. 5, 896-904, out.
22 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12454>
- 23 MADIGAN, M. T.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; SATTLEY, W. M.; STAHL, D. A.
24 **Brock Biology of Microorganisms**. 15. ed. Nova York: Pearson, 2018.
- 25 MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.
26 E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-
27 LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.;
28 VATAPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-
29 resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim
30 standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18,
31 n. 3, p. 268-281, mai. 2011. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- 32 MARTINEZ-MOLINA, E.; DEL RIO, L. A.; OLIVARES, J. Copper and iron as determinant
33 factors of antibiotic production by *Pseudomonas reptilivora*. **Journal of Applied**
34 **Bacteriology**, v. 41, p. 69-74, fev. 1976. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1976.tb00606.x>
- 36 MIYAGISHIMA, T.; YAMAGUCHI, T.; UMINO, K. Further studies on synthesis and
37 antimicrobial activity of thioformin analogues. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**,
38 v. 22, n. 10, p. 2283-2287, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.22.2283>
- 39 MOHAMED, S. H.; SALEM, D.; AZMY, M.; FAM, N. S. Antibacterial and antibiofilm
40 activity of cinnamaldehyde against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in
41 Egypt: in vitro study. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 11, p. 151-

- 1 156, nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.81121>
- 2 MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v.
3 5, n. 11, nov. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050307>
- 4 MUNHOZ, L. D.; FONTEQUE, J. P.; SANTOS, I. M. O.; NAVARRO, M. O. P.;
5 SIMIONATO, A. S.; GOYA, E. T.; REZENDE, M. I.; BALBI-PEÑA, M. I.; OLIVEIRA, A.
6 G.; ANDRADE, G. Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive
7 compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Cogent Food &**
8 **Agriculture**, v. 3, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1282592>
- 9 National Institutes of Health (NIH). **Research on microbial biofilms, report no. PA-**
10 **03-047**. 2002. Disponível em: [https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/pa-03-](https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/pa-03-047.html)
11 [047.html](https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/pa-03-047.html). Acesso em mar. 2021.
- 12 NAVARRO, M. O. P.; DILARRI, G.; SIMIONATO, A. S.; GRZEGORCZYK, K.; DEALIS,
13 M. L.; CANO, B. G.; BARAZETTI, A. R.; AFONSO, L.; CHRYSSEAFIDIS, A. L.;
14 FERREIRA, H.; ANDRADE, G. Determining the targets of fluopsin C action on Gram-
15 negative and Gram-positive bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 1076, jun.
16 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01076>
- 17 NAVARRO, M. O. P.; SIMIONATO, A. S.; PÉREZ, J. C. B.; BARAZETTI, A. R.;
18 EMILIANO, J.; NIEKAWA, E. T. G.; ANDREATA, M. F. L.; MODOLON, F.; DEALIS, M.
19 L.; ARAÚJO, E. J. A.; CARLOS, T. M.; SCARPELIM, O. J.; SILVA, D. B.;
20 CHRYSSEAFIDIS, A. L.; BRUHEIM, P.; ANDRADE, G. Fluopsin C for treating multidrug-
21 resistant infections: *in vitro* activity against clinically important strains and *in vivo* efficacy
22 against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**,
23 v. 10, n. 2431, out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02431>
- 24 OLIVEIRA, A. G.; MURATE, L. S.; SPAGO, F. R.; LOPES, L. P.; BERANGER, J. P. O.;
25 SAN MARTIN, J. A. B.; NOGUEIRA, M. A.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, C. G. T. J.;
26 ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced
27 by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological**
28 **Control**, v. 56, p. 125-131, fev. 2011. DOI:
29 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.008>.
- 30 OLIVEIRA, A. G.; SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O. P.; ANDRADE, G.
31 Antimicrobianos naturais produzidos por microrganismos: da busca à identificação. *In*:
32 YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M. C.; NOGUEIRA, M. A.
33 (orgs.). **Tópicos Especiais em Microbiologia**, 1. ed. Londrina: Eduel, 2015. p. 180-199.
- 34 OLIVEIRA, A. G.; SPAGO, F. R.; SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O. P.; SILVA, C.
35 S.; BARAZETTI, A. R.; CELY, M. V. T.; TISCHER, C. A.; MARTIN, J. A. B. S.; ANDRADE,
36 C. G. T. J.; NOVELLO, C. R.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, G. Bioactive organocopper
37 compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri*
38 subsp. *citri*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 113, fev. 2016. DOI:
39 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00113>
- 40 OTSUKA, H.; NIWAYAMA, S.; TANAKA, H.; TAKE, T.; UCHIYAMA, T.; NAKAZAWA, H.;
41 ABE, K.; KOIZUMI, K. An antitumor antibiotic, no. 4601 from *Streptomyces*, identical with
42 YC 73 of *Pseudomonas* origin. **The Journal of Antibiotics**, v. 25, n. 6, p. 369-370, jun.

- 1 1972. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.25.369>
- 2 PATRICK, G. L. **An Introduction to Medical Chemistry**. 6. ed. United Kingdom: Oxford
3 University Press, 2017.
- 4 PENESYAN, A.; NAGY, S. S.; KJELLEBERG, S.; GILLINGS, M. R.; PAULSEN, I. T.
5 Rapid microevolution of biofilm cells in response to antibiotics. **npj Biofilms and**
6 **Microbiomes**, v. 5, n. 34, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0108-3>
- 7 PENG, H.; ZHANG, P.; BILAL, M.; WANG, W.; HU, H.; ZHANG X. Enhanced
8 biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by engineered *Pseudomonas chlororaphis*
9 HT66. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 117, jul. 2018. DOI:
10 <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0962-3>
- 11 PHAM, J. V.; YILMA, M. A.; FELIZ, A.; MAJID, M. T.; MAFFETONE, N.; WALKER, J. R.;
12 KIM, E.; CHO, H. J.; REYNOLDS, J. M.; SONG, M. C.; PARK, S. R.; YOON, Y. J. A
13 review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. **Frontiers**
14 **in Microbiology**, v. 10, n. 1404, jun. 2019. DOI:
15 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01404>
- 16 PISTORI, J. F.; SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O. P.; ANDREATA, M. F. L.;
17 SANTOS, I. M. O.; MENEGUIM, L.; LEITE JÚNIOR, R. P.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE,
18 G. Low-molecular-weight metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* as an
19 alternative to control huanglongbing in *Citrus sinensis* cv. Valencia. **Tropical Plant**
20 **Pathology**, v. 43, p. 289-296, jul. 2018. DOI: [https://doi.org/10.1007/s40858-018-0231-](https://doi.org/10.1007/s40858-018-0231-3)
21 3
- 22 PRICE-WHELAN, A.; DIETRICH, L. E. P.; NEWMAN, D. K. Rethinking 'secondary'
23 metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. **Nature Chemical Biology**,
24 v. 2, p. 71-78, jan. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/nchembio764>
- 25 QUINTANA, J.; NOVOA-APONTE, L.; ARGÜELLO, J. M. Copper homeostasis
26 networks in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological**
27 **Chemistry**, v. 292, n. 38, p. 15691-15704, jul. 2017. DOI:
28 <https://doi.org/10.1074/jbc.m117.804492>
- 29 RAMPAZO, L. G. L. **Avaliação de agentes biológicos e seus produtos na incidência**
30 **de lesões foliares do cancro cítrico**. 2004. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) –
31 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.
- 32 RANGEL, K.; LECHUGA, G. C.; SOUZA, A. L. A.; CARVALHO, J. P. R. S.; BÔAS, M.
33 H. S. V.; SIMONE, S. G. Pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, but not other
34 strains, are resistant to the bee venom peptide melittin. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, abr.
35 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040178>.
- 36 REFFUVEILLE, F.; FUENTE-NÚÑEZ, C.; MANSOUR, S.; HANCOCK, R. E. W. A
37 broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial
38 biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5363-5371, set.
39 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1128%2FAAC.03163-14>
- 40 ROMANIN, P.; PALERMO, R. L.; CAVALINI, J. F.; FÁVARO, L. S.; PAULA-PETROLI,
41 S. B.; FERNANDES, E. V.; SZCZEREPA, M. M. A.; TOGNIM, M. C. B.; YAMADA-

- 1 OGATTA, S. F.; CARRARA-MARRONI, F. E.; YAMAUCHI, L. M. Multidrug- and
2 extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary hospital from Brazil:
3 the importance of carbapenemase encoding genes and epidemic clonal complexes in
4 a 10-year study. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 9, p. 1365-1373, nov. 2019.
5 DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0002>
- 6 ROSSI, F.; GIRARDELLO, R.; CURY, A. P.; DI GIOIA, T. S. R.; ALMEIDA JR., J. N.;
7 DUARTE, A. J. S. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital
8 complex of São Paulo, Brazil, over five years. **The Brazilian Journal of Infectious**
9 **Diseases**, v. 21, p. 98-101, jan./fev. 2017. DOI:
10 <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.09.011>
- 11 SELVARAJ, A.; VALLIAMMAI, A.; SIVASANKAR, C.; SUBA, M.; SAKTHIVEL, G.;
12 PANDIAN, S. K. Antibiofilm and antivirulence efficacy of myrtenol enhances the
13 antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. **Scientific Reports**, v. 10, n.
14 21975, dez. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79128-x>.
- 15 SHARIFIPOUR, E.; SHAMS, S.; ESMKHANI, M.; KHODADADI, J.; FOTOUHI-
16 ARDAKANI, R.; KOOHPAEI, A.; DOOSTI, Z.; GOLZARI, S. E. J. Evaluation of bacterial
17 co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. **BMC**
18 **Infectious Diseases**, v. 20, n. 646, set. 2020. DOI: [https://doi.org/10.1186/s12879-](https://doi.org/10.1186/s12879-020-05374-z)
19 [020-05374-z](https://doi.org/10.1186/s12879-020-05374-z)
- 20 SHIRAHATA, K.; DEGUCHI, T.; HAYASHI, T.; MATSUBARA, I.; SUZUKI, T. The
21 structures of fluopsins C and F. **The Journal of Antibiotics**, v. 23, n. 11, p. 546-550,
22 nov. 1970. DOI: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.23.546>
- 23 SHIRAHATA, K.; HAYASHI, T.; MATSUBARA, I. Syntheses of fluopsins. **The Journal**
24 **of Antibiotics**, v. 24, n. 2, p. 140-141, fev. 1971. DOI:
25 <https://doi.org/10.7164/antibiotics.24.140>
- 26 SIDDIQUI, S.; IRAM, F.; SIDDIQUI, S.; SAHU, K. Role of natural products in drug
27 discovery process. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 6, n.
28 2, p. 172-204, jun. 2014.
- 29 SIMIONATO, A. S. **Bioprodutos para o controle da contaminação bacteriana na**
30 **fermentação alcoólica**. 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade
31 Estadual de Londrina, Londrina, 2016.
- 32 SIMIONATO, A. S. **Sequenciamento e montagem de novo do genoma total de**
33 ***Pseudomonas aeruginosa* cepa LV e análise da expressão gênica temporal e**
34 **diferencial na presença de cobre**. 2020. Tese (Doutorado em Microbiologia) –
35 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.
- 36 SIMIONATO, A. S.; GIONCO-CANO, B.; NAVARRO, M. O. P.; TAVARES, E. R.;
37 RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F.;
38 ANDRADE, G. Whole-genome sequence of bioactive compound-producing
39 *Pseudomonas aeruginosa* strain LV. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10,
40 n. e01120-20, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/MRA.01120-20>
- 41 SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O.; JESUS, M. L. A.; BARAZETTI, A. R.; SILVA,
42 C. S.; SIMÕES, G. C.; BALBI-PENÑA, M. I.; MELLO, J. C. P.; PANAGIO, L. A.;

- 1 ALMEIDA, R. S. C.; ANDRADE, G.; OLIVEIRA, A. G. The effect of phenazine-1-
2 carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas*
3 *aeruginosa* LV strain. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1102, jun. 2017. DOI:
4 <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01102>
- 5 STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.;
6 ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of
7 testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production
8 by staphylococci. **APMIS**, v. 155, n. 8, p. 891-899, ago. 2007. DOI:
9 https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- 10 STRAHL, H.; HAMOEN, L. W. Membrane potential is important for bacterial cell division.
11 **PNAS**, v. 107, n. 27, p. 12281-12286, jul. 2010. DOI:
12 <https://doi.org/10.1073/pnas.1005485107>.
- 13 TAVARES, L. C. B.; VASCONCELLOS, F. M.; SOUSA, W. V.; ROCCHETTI, T. T.;
14 MONDELLI, A. L.; FERREIRA, A. M.; MONTELLI, A. C.; SADATSUNE, T.; TIBA-
15 CASAS, M. R.; CAMARGO, C. H. Emergence and persistence of high-risk clones
16 among MDR and XDR *A. baumannii* at a Brazilian teaching hospital. **Frontiers in**
17 **Microbiology**, v. 9, n. 2898, jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02898>
- 18 TIWARI, V.; TIWARI, D.; PATEL, V; TIWARI, M. Effect of secondary metabolite of
19 *Actinidia deliciosa* on the biofilm and extra-cellular matrix components of *Acinetobacter*
20 *baumannii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 345-351, set. 2017. DOI:
21 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.013>
- 22 TUTAR, U.; ÇELİK, C.; KARAMAN, I.; ATAŞ, M.; HEPOKUR, C. Anti-biofilm and
23 antimicrobial activity of *Mentha pulegium* L essential oil against multidrug-resistant
24 *Acinetobacter baumannii*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n.
25 5, p. 1039-1046, mai. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v15i5.20>
- 26 VALENCIA-MARTÍN, R.; GONZALEZ-GALAN, V.; ALVAREZ-MARÍN, R.; CAZALLA-
27 FONCUEVA, A. M.; ALDABÓ, T.; GIL-NAVARRO, M. V.; ALONSO-ARAUJO, I.;
28 MARTIN, C.; GORDON, R.; GARCÍA-NUÑEZ, E. J.; PEREZ, R.; PEÑALVA, G.;
29 AZNAR, J.; CONDE, M.; CISNEROS, J. M. A multimodal intervention program to
30 control a long-term *Acinetobacter baumannii* endemic in a tertiary care hospital.
31 **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 199, dez. 2019. DOI:
32 <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0658-4>
- 33 VASCONCELLOS, F. C. S.; OLIVEIRA, A. G.; LOPES-SANTOS, L.; BERANGER, J. P.
34 O.; CELY, M. V. T.; SIMIONATO, A. S.; PISTORI, J. F.; SPAGO, F. R.; MELLO, J. C. P.;
35 SAN MARTIN, J. A. B.; ANDRADE, C. G. T. J.; ANDRADE, G. Evaluation of antibiotic
36 activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas*
37 *arboricola* pv. *pruni*. **Agricultural Sciences**, v. 5, p. 71-76, 2014. DOI:
38 <http://dx.doi.org/10.4236/as.2014.51008>
- 39 VUKOTIC, G.; OBRADOVIC, M.; NOVOVIC, K.; DI LUCA, M.; JOVCIC, B.; FIRA, D.;
40 NEVE, H.; KOJIC, M.; MCAULIFFE, O. Characterization, antibiofilm, and
41 depolymerizing activity of two phages active on carbapenem-resistant *Acinetobacter*
42 *baumannii*. **Frontiers in Medicine**, v. 7, n. 426, ago. 2020. DOI:
43 <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00426>

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Prioritization of pathogens to guide**
- 2 **discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant**
- 3 **bacterial infections, including tuberculosis**. Geneva: WHO, 2017.

- 4 ZAVASCKI, A. P.; NATION, R. L. Nephrotoxicity of polymyxins: is there any difference
- 5 between colistimethate and polymyxin B?. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,
- 6 v. 61, n. 3, mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.02319-16>

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29

APÊNDICES

APÊNDICE A

1
2
3
4
5
6
7

Tabela Suplementar 1 – Compêndio da sensibilidade *in vitro* de microrganismos frente à fluopsina C descritos na literatura. Os dados reportados encontram-se organizados cronologicamente e categoricamente agrupados como bactérias Gram-positivas (roxo), bactérias Gram-negativas (vermelho), bactérias com paredes celulares atípicas (amarelo), fungos (verde), oomicetos (azul) e algas (cinza).

Microrganismo	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Método e Referência
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	0,09	
<i>Clostridium tetani</i>	1,56	
<i>Clostridium welchii</i>	3,12	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> P.W.Nº.8	1,56	
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	0,78	
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P; Terashima; Smith; R-1 ^b ; e R-1 ^c	0,09	
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	0,78	
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama	0,19	
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	1,56	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,12	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,19	
<i>Neisseria meningitidis</i> group A 13077	0,19	
<i>Neisseria meningitidis</i> group B 13090	0,19	
<i>Proteus vulgaris</i>	0,19	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1095	12,5	Diluição serial (CP)
<i>Salmonella typhosa</i> T-58	0,39	(EGAWA <i>et al.</i> , 1970)
<i>Shigella dysenteriae</i>	0,78	
<i>Shigella flexneri</i> 2a	0,78	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	3,12	
<i>Aspergillus niger</i>	25,0	
<i>Candida albicans</i>	3,12	
<i>Epidermophyton floccosum</i>	3,12	
<i>Hansenula anomala</i>	1,56	
<i>Microsporium canis</i>	6,25	
<i>Penicillium notatum</i>	50,0	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,78	
<i>Torula utilis</i>	3,12	
<i>Trichophyton concentricum</i>	6,25	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	6,25	
<i>Trichophyton rubrum</i>	3,12	
<i>Willia anomala</i>	3,12	
<i>Bacillus subtilis</i> 10707	0,16	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0,16	
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 10541	0,65	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 26; e MDR	0,65	Ágar diluição (CP)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	0,65	(ITOH; INUZUKA; SUZUKI, 1970)
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6897	0,16	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BMH 1	>83	
<i>Salmonella typhosa</i> ATCC 9992	0,65	
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290	0,65	
<i>Bacillus anthracis</i> 2	0,39	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1,56	Não descrito (CP)
<i>Diplococcus pneumoniae</i> 1	1,56	(OTSUKA <i>et al.</i> , 1972)
<i>Sarcina lutea</i> PCI 1001	0,78	

<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	0,78	
<i>Streptococcus faecalis</i> 5	3,12	
<i>Streptococcus haemolyticus</i> 693	1,56	
<i>Bordetella pertussis</i> T	0,195	
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> 90	0,195	
<i>Escherichia coli</i> B	1,56	
<i>Escherichia coli</i> K-12	3,12	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> K-1	3,12	
<i>Proteus vulgaris</i> X-19	3,12	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35	50,0	
<i>Salmonella typhosa</i> 378	1,56	
<i>Shigella flexneri</i> 3a 3196	1,56	
<i>Mycobacterium phlei</i> 607	0,78	
<i>Aspergillus niger</i> N-1	6,25	
<i>Candida albicans</i> YU-1200	3,12	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,0 - 2,0	
<i>Pseudomonas syringae</i> var. <i>syringae</i>	2,0 - 3,0	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	15,0 - 20,0	
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	0,4 - 0,6	
<i>Candida albicans</i>	3,0 - 4,0	
<i>Fusarium culmorum</i>	5,0 - 6,0	Microdiluição em caldo (CP)
<i>Fusarium oxysporum</i>	4,0 - 5,0	(HEDMAN <i>et al.</i> , 2004)
<i>Heterobasidion annosum</i>	0,1 - 0,2	
<i>Microsporium canis</i>	0,8 - 1,0	
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	6,0 - 7,0	
<i>Pythium ultimum</i>	0,1 - 0,2	
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0,8 - 1,0	
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306	19,53	Microdiluição em caldo de F3 (CSP) (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Staphylococcus aureus</i> N315; e BEC9393	125,0	Microdiluição em caldo de F3d (CSP) (CARDOZO <i>et al.</i> , 2013)
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	50,0	Microdiluição em caldo de F3 (CSP) (VASCONCELLOS <i>et al.</i> , 2014)
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306	6,25	Microdiluição em caldo de F3d (CSP) (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2016)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	1,95	Microdiluição em caldo (CP)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC3	3,90	(KERBAUY <i>et al.</i> , 2016)
<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>bla</i> _{OXA-23} ; <i>bla</i> _{OXA-58} ; <i>bla</i> _{OXA-72} ; <i>bla</i> _{OXA-143} ; <i>bla</i> _{OXA-231}	7,8	Microdiluição em caldo de F3d (CSP)
<i>Acinetobacter baumannii</i> Ac S171/5	3,9	(GIONCO, 2016)
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	7,81	Microdiluição em caldo de F4A (CSP) (MUNHOZ <i>et al.</i> , 2017)
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569; e VRE-170	1,0	
<i>Staphylococcus aureus</i> BEC9393	1,0	Microdiluição em caldo (CP)
<i>Staphylococcus aureus</i> N315	0,5	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	1,0	(NAVARRO <i>et al.</i> , 2019)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CRE kpn19	2,0	

1 (CP) Composto puro; ²(CSP) Composto semi-purificado.

2 Fonte: o próprio autor.

3

APÊNDICE B

Artigo formatado nas normas da revista *Frontiers in Microbiology* (ISSN 1664-302X)

Fluopsin C promotes biofilm removal and reduces remaining sessile cells viability of XDR *Acinetobacter baumannii* clinical isolates besides presenting an additive effect with polymyxin B in planktonic cells

Leandro Afonso¹, Bárbara Gionco-Cano¹, Juan Carlos Bedoya Pérez², Galdino Andrade^{1*}

¹Microbial Ecology Laboratory, State University of Londrina, Microbiology Department, Londrina, Paraná, Brazil.

²Faculty of Health Sciences, University Institution Colegio Mayor de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia.

***Correspondence:**

Dr. Galdino Andrade

andrade@uel.br

Keywords: Secondary metabolite, *Pseudomonas aeruginosa* LV strain, thioformin metal complex, organometallic antimicrobial, antibiofilm effect.

Abstract

The antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii* is increasing rapidly, and isolates resistant to all commercial antibiotics are reported around the world. Biofilm production in this species enhances the adhesion and persistence in many types of surfaces, as well as its pathogenicity. Moreover, biofilms also provide a physical barrier to the action of antimicrobials and disinfectants. All of these characteristics culminated in the classification of *A. baumannii* as the priority pathogen of the World Health Organization to development of new antimicrobials. However, microbial metabolites have been poorly explored in this context, especially in targeting efficiently both sessile and planktonic cells. Fluopsin C (FlpC) is an organocupric compound with low-molecular-weight produced by few species of *Pseudomonas* and *Streptomyces* secondary metabolism and presents a broad spectrum of antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including multidrug-resistant strains. In this study, we investigate antibiofilm activity of FlpC in established biofilms of extensively drug-resistant (XDR) *A. baumannii* and also the effects of its combination with polymyxin B (PolB) in planktonic cells. The minimum inhibitory concentration (MIC) of FlpC on XDR *A. baumannii* was 3.5 µg mL⁻¹ for all isolates tested. When combined FlpC with PolB, an additive effect was observed, increasing the susceptibility of tested bacteria to both antibiotics. Established biofilms were highly affected by 24 h FlpC exposure, which has removed 95.25% of the biofilm biomass with 7.0 µg mL⁻¹, following by 95.10% with 3.5 µg mL⁻¹, in CI 230. Additionally, in 3,5 µg mL⁻¹, we observed reductions in viable cells number and the dispersion of the biofilm matrix of CI 230. Obtained data enforces the hypothesis that FlpC is a promissory compound with antimicrobial and antibiofilm activity against XDR *A.*

1 *baumannii* strains, and could help in the future, in new drug development or disinfectant agents,
2 to enhance the removal of pathogens on surfaces.

3 4 **1 Introduction**

5
6 *Acinetobacter baumannii* represents one of the most threatening pathogenic bacteria worldwide
7 nowadays. These Gram-negative coccobacilli are highly related to healthcare-associated
8 infections, especially in high-risk settings, such as intensive care units, which in many hospitals
9 have become endemic in these environments (Lin and Lan, 2014; Sultan and Seliem, 2018).

10
11 Its large repertoire of intrinsic resistance to antimicrobials, the capacity to thrive under
12 unfavorable environmental conditions, and to form biofilms are some of the factors related to
13 the success of this pathogen in hospital settings (Lin and Lan, 2014; Valencia-Martín *et al.*,
14 2019).

15
16 Biofilm formation is an important factor regarding *A. baumannii* infections and antimicrobial
17 resistance, once it increases its attachment and survival on multiple types of surfaces, enhancing
18 its survival and spread, while protects sessile cells from inhibitory agents as disinfectants and
19 antimicrobials by a physical barrier establishment (Greene *et al.*, 2016; Bardbari *et al.*, 2018;
20 Rangel *et al.*, 2020).

21
22 Additionally, carbapenem-resistant (CR) *A. baumannii* was elected by WHO in 2017 as the top
23 pathogen in the critical priority group for research and development of new antibiotics, once
24 only polymyxin B (PolB), colistin (polymyxin E), and tigecycline is seen to be effective against
25 these strains. However, polymyxins nephrotoxicity and rising resistance rates added to
26 tigecycline ambiguous activity compromises clinical outcomes (Kim *et al.*, 2014; Garnacho-
27 Montero and Timsit, 2019). In this alarming context, where commercial antimicrobials are no
28 longer effective, the development of new antibiotics and antibiofilm agents derived from natural
29 products is a very suitable and necessary approach.

30
31 Fluopsin C (FlpC) (also referred to as YC 73) corresponds chemically to bis(*N*-
32 methylthioformohydroxamato)Cu(II) and is a low-molecular-weight secondary metabolite
33 produced by *Pseudomonas* spp. and *Streptomyces* sp. (Egawa *et al.*, 1970; Otsuka *et al.*, 1972;
34 Kakkar, Dua, and Gahlot, 2007; Pistori *et al.*, 2018).

35
36 Its biosynthesis is triggered as a bioremediation response to high levels of intracellular cupric
37 ions (Gionco *et al.*, 2017) in which these ions are complexed to thioformin siderophore
38 molecules (Leong and Bell, 1978; Kakkar, Dua, and Gahlot, 2007), resulting in an
39 organometallic complex that features great antimicrobial and antitumoral activities (Otsuka *et*
40 *al.*, 1972; Ma *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2019).

41
42 This compound can be purified from microbial cultures supernatant as thin dark-green-
43 brownish prismatic crystals (Egawa *et al.*, 1970; Shirahata *et al.*, 1970) and bioprospecting of
44 FlpC-producing *Pseudomonas aeruginosa* LV strain in 2004 (Rampazo, 2004) enabled our
45 group to conduct several investigations regarding its antimicrobial activity in the past 17 years.

46
47 To date, we demonstrated the efficacy of the metabolite against important human pathogens,
48 such as KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains (Kerbaui *et al.*, 2016), CR *A. baumannii*
49 (Gionco, 2016), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Cardozo *et al.*, 2013), and

1 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (Navarro *et al.*, 2019; 2020). Nevertheless,
2 antibiofilm properties of the compound are still poorly investigated, and therefore, understood.

3
4 In this research we propose the examination of antibiofilm property of FlpC in established
5 biofilms of XDR clinical isolates (CIs) of *A. baumannii* as a removal agent, its effect on sessile
6 cells viability, and its interaction with PolB against planktonic cells.

7 8 **2 Methods**

9 10 **2.1 Microorganisms**

11
12 Six *A. baumannii*, recovered from the tracheal secretion of inpatients of public southern
13 Brazilian tertiary hospital belonging to the State University of Londrina in 2019 (Londrina,
14 Paraná, Brazil), and the reference strain *A. baumannii* ATCC[®] 19606[™] were stored in tryptic
15 soy broth (TSB) (Merck, Germany) plus 40% (v/v) glycerol at -20 °C. These strains were
16 selected according to their resistance profiles

17
18 FlpC-producer *P. aeruginosa* LV strain was isolated from old leaf lesions of orange tree (*Citrus*
19 *sinensis* cv. Valencia) with citrus canker disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri
20 at Astorga city, Paraná, Brazil (Rampazo, 2004) (GenBank n° CP058323). LV strain was
21 maintained on nutrient broth (NB) plus 0.1 (w/v) CuCl₂·2H₂O and 40% (v/v) glycerol at -20
22 °C.

23 24 **2.2 Antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates**

25
26 Antimicrobial susceptibility profiles of *A. baumannii* clinical isolates (CIs) were determined by
27 Vitek[®] 2 Compact (bioMérieux, France) automatized system for the antimicrobials: amikacin,
28 gentamicin, ampicillin-sulbactam, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, imipenem, meropenem,
29 piperacillin-tazobactam, ciprofloxacin, and colistin. Disk diffusion assays were performed for
30 amikacin, gentamicin, levofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and tetracycline. PolB
31 and tigecycline susceptibility was evaluated through the broth microdilution method. The
32 results were interpreted accordingly to the Clinical and Laboratory Standards Institute cut-off
33 values (CLSI, 2020), and based on the resistance profiles, the clinical isolates were classified
34 as proposed by Magiorakos *et al.*, 2011.

35 36 **2.3 Fluopsin C production and extraction from the supernatant**

37
38 FlpC production process followed the established patented procedure PI0803350-1 (Andrade,
39 2008) with the modifications proposed by Bedoya *et al.* (2019). From stock cultures, *P.*
40 *aeruginosa* LV strain cells were cultivated twice in nutrient agar plus copper chloride at
41 formulation (in g L⁻¹): peptone 5.0; meat extract 3.0; copper chloride (CuCl₂·2H₂O) 0.1; and
42 agar 15.0 (final pH adjusted to 7.0 ± 0.2), at 28 °C during 48 h and 24 h, respectively.

43
44 Isolated LV colonies were resuspended into sterile 0.85% (w/v) NaCl solution and cell density
45 was adjusted to optical density (O.D._{590nm} = 0.09; equivalent to 10⁸ colony-forming units [CFU]
46 mL⁻¹). Erlenmeyer flasks of 500 mL containing 100 mL of NB plus copper chloride, formulated
47 as (in g L⁻¹): peptone 2.0; meat extract 1.2; and CuCl₂·2H₂O 0.03 (final pH adjusted to 6.8 ±
48 0.2), were inoculated with 10% (v/v) of the adjusted cellular suspension and incubated for 8
49 days at 28 °C and 170 rpm in Lab Companion IS-971 (Jeio Tech, Korea) orbital shaker.

50

1 LV cultures were centrifugated at 9000 rpm and 4 °C for 15 min, and the free-cell supernatants
2 were acidified to pH 4.0 with HCl solution (1 M), being subjected again to centrifugation at the
3 same conditions. Acidified cell-free supernatant was dried for 48 h at 60 °C. Dried extracts
4 were submitted to liquid-liquid extraction using dichloromethane at 1:2 (v/v) proportion and
5 the process was repeated three times. Dichloromethane phase (DP) was collected and
6 concentrated in rotary evaporator Rotavapor R-215 (Büchi, Switzerland).

7 8 **2.4 Fluopsin C purification by flash chromatography**

9
10 FlpC was purified from DP through two sequential procedures of flash chromatography (FC),
11 both using 10 mm diameter glass columns filled with 15 cm of silica gel 60 (0.040-0.063
12 mm/230-400 mesh ASTM) (Macherey-Nagel, Germany) slurry packed with n-hexane. In the
13 first FC, the mobile phase was composed of (v/v): dichloromethane: ethyl acetate (95:5) and,
14 in the second FC dichloromethane: ethyl ether (90:10).

15
16 Fractions of approximately 1 mL were collected and submitted to thin-layer chromatography
17 (TLC) performed in Alugram Xtra SIL G/UV₂₅₄ pre-coated sheets (0.20 mm silica gel 60 layer)
18 (Macherey-Nagel, Germany) using a mixture of (v/v) cyclohexane: chloroform: methanol
19 (45:45:10) as mobile phase. Chromatograms spots were observed on UV 254 and 366 nm and
20 purest fractions of the compound were combined, characterized by high-performance liquid
21 chromatography (HPLC), and used as the standard antimicrobial.

22 23 **2.5 Fluopsin C characterization by HPLC**

24
25 Purified FlpC was characterized by HPLC using Agilent 1260 Infinity (Agilent ChemStation
26 software, Agilent Technologies, USA) with an adapted method from Bedoya *et al.* (2019). The
27 analysis was carried using the C18 reverse-phase column Zorbax 300SB-C18 (5 µm x 4.6 mm
28 x 250 mm) (Agilent Technologies, USA) and a gradient system of acidified ultrapure water (1%
29 v/v of acetic acid) (A) to acetonitrile (B) at the flow rate of 1 mL min⁻¹ under the conditions
30 (%): (A) 99:01 (B) to (A) 85:15 (B), during 2 min.; to (A) 17:83 (B) during 20 min.; and
31 returning to (A) 99:01 (B) during 2 min, and staying in this condition for 3 min (run total time
32 equal to 27 min).

33
34 FlpC samples were prepared by diluting 1 mg of the compound in 1 mL of acetonitrile,
35 following the solution was filtered in 0.22 µm membrane (20 mm diameter filter) (Macherey-
36 Nagel). 10 µL of the sample was injected into the equipment, and the presence of FlpC was
37 monitored in 262 nm wavelength and an averaged retention time of 14 min.

38 39 **2.6 Screening for fluopsin C susceptibility by agar diffusion method**

40
41 Disk diffusion assay was performed accordingly to CLSI guidelines (CLSI, 2018). Briefly, 18
42 h growth colonies in Mueller-Hinton agar (MHA) (Acumedia, USA) of *A. baumannii* were
43 resuspended in sterile saline solution and adjusted to 0.5 McFarland (10⁸ CFU mL⁻¹), then the
44 suspensions were inoculated onto MHA plates through streaking with sterile cotton swabs.
45 Paper disks (6 mm) (Laborclin, Brazil) were impregnated with FlpC diluted in 100% dimethyl
46 sulfoxide (DMSO) (Neon, Brazil) at a concentration of 10 µg disk⁻¹. Negative controls consisted
47 of 10 µL disk⁻¹ of solely DMSO. The plates were incubated for 24 h at 37 °C, and the
48 antimicrobial activity of the compound was evaluated by measuring inhibition zone diameters
49 (mm) formed around the disks. The test was performed twice with independent cultures and the
50 result was averaged.

2.7 Determination of the minimum inhibitory concentrations (MICs)

MICs of FlpC to *A. baumannii* CIs and ATCC 19606 were determined following CLSI guidelines for broth microdilution method (CLSI, 2012). The tests were performed into sterile flat-bottomed polystyrene 96-well plates (Sorfa Life Science Research co., China). FlpC was first diluted into 100% DMSO, following by two-fold dilution in the test concentrations range of 56 to 0.11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) (Neogen, USA). Final concentrations of DMSO incorporate into the dilution were between 1.12 to 0.002% (v/v). Bacterial inoculum was based on 24 h grown cells at 37 °C in MHA resuspended in sterile saline solution and adjusted to reach 10^5 CFU mL^{-1} in each well. CAMHB alone or inoculated with the microorganisms were considered the controls of media sterility and positive growth, respectively.

After 20 h of incubation at 37 °C, 20 μL of 1% (w/v) 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) (Sigma-Aldrich, USA) was added to each well following an additional incubation for 30 min at 37 °C. Afterward, TTC evidenced the presence of bacterial metabolic activity, turning media in the wells with viable cells to red. MICs were determined as the lowest concentrations of FlpC that completely inhibit the visual growth of the tested bacteria. The test was performed twice with independent cultures.

2.8 Synergism assay by the microdilution checkerboard method

To evaluate the effects of combining FlpC with the commercial antimicrobial PolB, the checkerboard method was performed. Both antimicrobials were first diluted in CAMHB. FlpC solution was two-fold diluted to concentrations ranging from 14 to 0.109 $\mu\text{g mL}^{-1}$ directly on 96-well plates, in contrast, PolB sulfate 500.000 IU (Eurofarma, Brazil) was diluted two-fold separately, to the concentrations range from 32 to 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, then was transferred to the respective wells.

Inoculum for the test was based on the final cellular density of 10^5 CFU mL^{-1} per well and was prepared identically to inoculum for MICs. CAMHB inoculated with bacteria or alone were considered the growth control and sterility control, respectively. Plates were incubated for 20 h at 37 °C, and TTC was used to access metabolic activity in the treatments as described above.

The fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated and interpreted as recommended by Sopirala *et al.* (2010) as represented in Equation 1, being the sum of the fractional inhibitory concentrations (FIC) of FlpC and PolB (Equations 2 and 3, respectively).

$$\text{(Eq. 1) } FICI = FIC_{fluopsin\ C} + FIC_{polymyxin\ B}$$

$$\text{(Eq. 2) } FIC_{fluopsin\ C} = \left(\frac{MIC\ of\ fluopsin\ C\ in\ combination}{MIC\ of\ fluopsin\ C\ alone} \right);$$

$$\text{(Eq. 3) } FIC_{polymyxin\ B} = \left(\frac{MIC\ of\ polymyxin\ B\ in\ combination}{MIC\ of\ polymyxin\ B\ alone} \right);$$

FICIs had their effects categorized as synergy when $FICI \leq 0.5$; additivity when $0.5 < FICI \leq 1.0$; no interaction when $1.0 < FICI \leq 4.0$; and antagonism when $FICI > 4.0$. Tests were performed twice using independent cultures.

2.9 Biofilm formation and quantification assay by the crystal violet method

Biofilm formation capacity by *A. baumannii* CIs was examined through the adapted crystal violet (CV) method from Stepanović *et al.* (2007). Briefly, 24 h growth colonies in MHA were resuspended in 5 mL of TSB plus 1% (w/v) glucose (TSB-G) and incubated for 18 h at 37 °C. The incubated cultures had their turbidity adjusted to 0.5 McFarland and then diluted 1:100 in the same broth (cell density of $\sim 10^6$ CFU mL⁻¹). 200 μ L of these cellular suspensions were added to sterile flat-bottomed polystyrene 96-well plates (Sorfa Life Science Research co., China) and incubated aerobically for 24 h at 37 °C. Negative controls consisted of TSB-G-filled wells and, to avoid edge effects, extremities wells were filled with sterile water (Wenderska *et al.*, 2011).

Subsequently to incubation, the wells had their broth aspirated and washed three times with sterile saline solution. Biofilms were allowed to dry at room temperature for 15 min and then were fixed with 200 μ L of 100% methanol for the same time. After methanol removal, the plates were dried again at the same conditions, and biofilms were stained with 0.1% (w/v) aqueous CV solution (Nuclear, Brazil) for 15 min. The excess of the stain was removed by three washings with sterile saline solution, the wells were dried once more at the same conditions. Finally, the CV was resolubilized with 200 μ L of methanol and the O.D. was measured using Asys UVM 340 scanning microplate reader (Biochrom, UK) in $\lambda = 570$ nm. The tests were performed in quintuplicate with three independent repetitions.

Cut-off values (OD_c) were established from the negative controls accordingly to Stepanović *et al.* (2007) and were expressed as the sum of the averaged O.D._{570nm} of the negative control with three times its standard deviation (SD) (Equation 4).

$$\text{(Eq. 4) } OD_c = \text{averaged } O.D._{570nm} + (3 \times SD)$$

Based on the amount of adherent biofilm formed in 24 h, the strains were classified as (1) no biofilm producer when $OD \leq OD_c$; (2) weak biofilm producer when $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$; (3) moderate biofilm producers when $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$; and (4) strong biofilm producer when $OD > 4 \times OD_c$.

2.10 Biofilm removal assay

The capacity of FlpC to remove established biofilms was examined through biofilm removal assays adapted from Bardbari *et al.* (2018). In these experiments, *A. baumannii* CIs and the reference strain were allowed to form biofilms as described before. Broths were aspirated and the wells were washed three times with 200 μ L of sterile saline solution, followed by drying at room temperature for 15 min.

FlpC was serially two-fold diluted in TSB-G, achieving concentrations ranging from 56 to 3.5 μ g mL⁻¹, and 200 μ L of the antimicrobial-containing broth was added to the wells. Treated biofilm plates were aerobically incubated for 24 h at 37 °C. For all assays, FlpC-free wells (untreated) and biofilm-free wells (negative control [nc]) were included as controls. After the incubation, biofilms were processed and stained as described before and the percentage of biofilm removed after exposure to different concentrations of FlpC was calculated accordingly to Pitts *et al.* (2003) (Equation 5). The tests were performed three times with independent cultures and the results were averaged.

$$(Eq. 5) \text{ Biofilm removal (\%)} = \left(\frac{(OD_{untreated} - OD_{nc}) - (OD_{treatment} - OD_{nc})}{(OD_{untreated} - OD_{nc})} \right) * 100$$

2.11 Biofilm cells viability after exposure to fluopsin C

Biofilm viability was examined through BacLight LIVE/DEAD bacterial viability kit L7012 (Invitrogen, USA) staining. The inoculum of *A. baumannii* CI 230 was obtained equally to previous biofilm experiments. 2 mL of the inoculated TSB-G ($\sim 10^6$ CFU mL⁻¹) were added to sterile flat-bottomed polystyrene 12-well plates (Kasvi, Brazil), and squared-glass coverslips 22x22 mm, previously sterilized and maintained during 24 h into 1% (v/v) acetic acid solution, were aseptically positioned in a right angle regarding the base of the wells. The plates were aerobically incubated for 24 h at 37 °C.

After the incubation, biofilms were formed both in wells and in the glass coverslip. Planktonic cells were removed by three times washing with sterile saline solution and then 2 mL of TSB-G containing 3.5 μ g mL⁻¹ of FlpC (MIC concentration) was added to the wells and plates were subjected to an additional incubation for 24 h at 37 °C. Controls were based on the addition of TSB-G without FlpC.

Glass coverslips containing biofilms were washed three times with sterile saline solution and dried at room temperature for 10 min. Sessile cells were submitted to LIVE/DEAD staining with a 1:1 (v/v) mixture of SYTO 9 (3.34 mM) and propidium iodide (20 mM) into sterile saline solution, which was further applied to biofilms and incubated in the dark for 15 min. Glass coverslips were then coupled to glass slides, being properly disinfected at the outer extremity, and immediately observed at Axio Imager A1 microscope (Zeiss, Germany) using excitation/emission wavelengths of 480/500 nm (SYTO 9) and 490/635 nm (propidium iodide).

2.12 Statistical analysis

The results were averaged and presented its standard deviation. Biofilm removal assays were analyzed through one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test to investigate differences in all the treatments for each bacterium, and also, to detect differences of the different bacteria response to each concentration of FlpC. All analyses were performed using Minitab[®] 19 software (Minitab, LCC, USA) considering $p < 0.05$ as a significant difference.

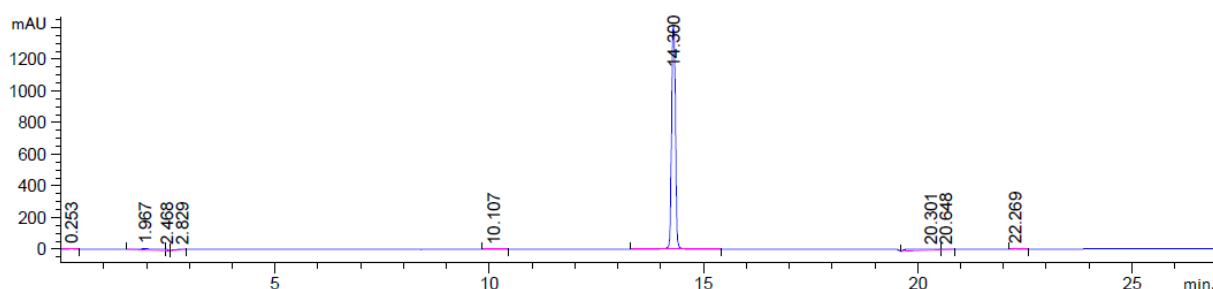
3 Results

3.1 Characterization of purified fluopsin C

FlpC purified from the FD supernatant extract through FC were morphologically characterized as dark-green thin prismatic crystals formed after complete solvent evaporation (Figure 1). HPLC chromatogram analysis defined the purity of the obtained solids as 90.45% at 262 nm, and FlpC presented a retention time of 14.3 min (Figure 2). The purified and characterized compound was used in all the following experiments.



1 **Figure 1** - Dark-green thin prismatic crystals of fluopsin C purified from *Pseudomonas*
 2 *aeruginosa* LV strain supernatant by two sequential flash chromatography processes.
 3



4 **Figure 2** - Purified fluopsin C solids chromatogram at 262 nm wavelength using a C18 (5 μ m
 5 x 4.6 mm x 250 mm) column washed with a gradient system of acidified ultrapure water (1%
 6 v/v acetic acid) to acetonitrile. Fluopsin C molecule was detected at 14.3 min. and indicated a
 7 high purity level (90.45%).
 8

9 **3.2 Screening for fluopsin C susceptibility among *A. baumannii* clinical isolates**

10
 11 All CIs examined in this study were classified as extensively drug-resistant (XDR) accordingly
 12 to Magiorakos *et al.* (2011) criteria as non-susceptible to one or more antimicrobial agents in
 13 all but one or two categories. A full description of resistance profiles and the FlpC susceptibility
 14 is presented in Table 1.

15
 16 The antimicrobial effect of FlpC screened by disk diffusion assay revealed the susceptibility of
 17 all strains to the natural compound (Figure 3). At 10 μ g disk⁻¹ concentration, FlpC promoted
 18 growth inhibition zones ranging from 16.5 \pm 0.71 mm (CI 226) to 22.3 \pm 0.58 mm (ATCC
 19 19606) (Table 1). DMSO disks (control) did not promote any inhibitory effect against the tested
 20 bacteria.

21
 22 Notably, MICs determined for all six CIs were equal to 3.5 μ g mL⁻¹ but differed from for the
 23 minimal concentration needed to inhibit the growth of the reference strain ATCC 19606
 24 (considered an overall more susceptible strain) which was equal to 1.75 μ g mL⁻¹ (Table 1).
 25

ID	Phenotypic resistance profile ¹	Inhibition zones FlpC (mm)	MIC FlpC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
CI 223	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LVX, CAZ, CRO, FEP, SXT, SAM, CST	18.5 ± 0.71	3.5
CI 224	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LVX, CAZ, CRO, FEP, SXT, SAM, CST, PMB	18.0 ± 1.41	3.5
CI 226	AMK, IPM, MEM, CIP, TZP, CAZ, CRO, SXT, PMB	16.5 ± 0.71	3.5
CI 227	AMK, IPM, MEM, CIP, LVX, CAZ, CRO, FEP, SXT, SAM, CST, PMB	18.5 ± 0.71	3.5
CI 230	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LVX, CAZ, CRO, FEP, SXT, SAM, PMB, TET	17.3 ± 1.53	3.5
CI 232	AMK, GEN, IPM, MEM, CIP, LVX, CAZ, CRO, FEP, SXT, SAM, PMB	20.0 ± 1.41	3.5
ATCC [®] 19606 [™]	-	22.3 ± 0.58	1.75

Table 1 - Antimicrobial susceptibility profiles of *Acinetobacter baumannii* for commercially available antimicrobials and fluopsin C. Antimicrobial effect of fluopsin C was determined through the inhibitory zones (mm) obtained by disk diffusion method ($10 \mu\text{g disk}^{-1}$) and MICs ($\mu\text{g mL}^{-1}$) by broth microdilution method.

¹(I) Amikacin = AMK, Gentamicin = GEN (aminoglycosides); (II) Imipenem = IPM, Meropenem = MPM (antipseudomonal carbapenems); (III) Ciprofloxacin = CIP, Levofloxacin = LVX (antipseudomonal fluoroquinolones); (IV) Piperacillin-tazobactam = TZP (antipseudomonal penicillins + β -lactamase inhibitors); (V) Ceftriaxone = CRO; Ceftazidime = CAZ, Cefepime = FEP (extended-spectrum cephalosporins); (VI) Trimethoprim-sulphamethoxazole = SXT (folate pathway inhibitors); (VII) Ampicillin-sulbactam = SAM (Penicillins + β -lactamase inhibitors); (VIII) Colistin = CST, Polymyxin B = PMB (polymyxins); (IX) Tetracycline = TET (tetracyclines).

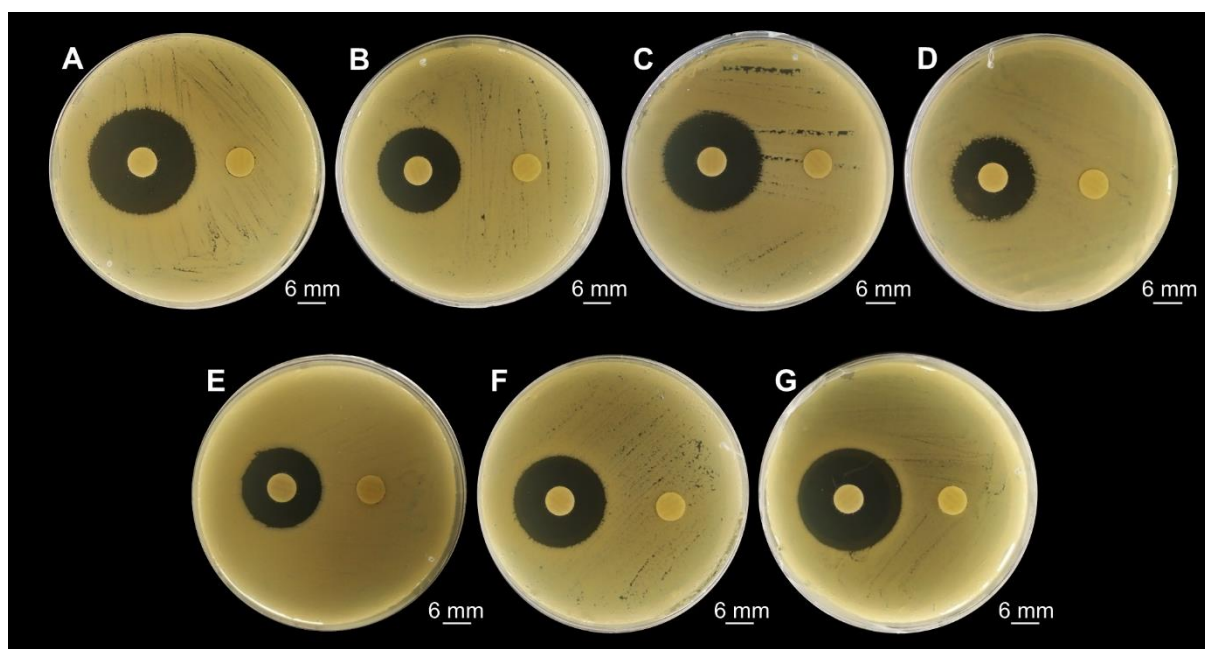


Figure 3 - Screening for fluopsin C susceptibility of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the reference strain ATCC 19606 by disk diffusion method. The disks on the right were impregnated with $10 \mu\text{g}$ of fluopsin C in DMSO, and disks on the left were impregnated with $10 \mu\text{L}$ of DMSO. (A) ATCC 19606; (B) CI 223; (C) CI 224; (D) CI 226; (E) CI 227; (F) CI 230; (G) CI 232.

3.3 Evaluation of combinatory effects of fluopsin C with polymyxin B

Drug combination assays performed with the natural antimicrobial FlpC and the commercial antimicrobial PolB determined a major additive interaction type between the compounds (Table 2). The concentration required to inhibit bacterial growth in the combination was two-fold lower for FlpC in all tests ($1.75 \mu\text{g mL}^{-1}$). In combination with the natural compound, PolB decreased dramatically its concentration, even for the most resistant isolate, reaching a MIC in the combination of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ to all tested strains, indicating a fold-decrease ranging from 2-32.

Strain	MIC FlpC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		MIC PolB ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		FICI	Interaction type
	Alone	Combined	Alone	Combined		
CI 223	3.5	1.75	2 (S)	1 (S)	1.00	Additive
CI 226	3.5	1.75	8 (R)	1 (S)	0.62	Additive
CI 227	3.5	1.75	32 (R)	1 (S)	0.53	Additive
CI 230	3.5	1.75	4 (R)	1 (S)	0.75	Additive

Table 2 - Effect of fluopsin C in combination with polymyxin B on planktonic cells of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Polymyxin B susceptibility profiles are represented as resistant (R) and sensitive (S).

3.4 Characterization of biofilm formation capacities by *A. baumannii* strains

To characterize the capacity of the tested *A. baumannii* strains to produce adherent biofilms in polystyrene surfaces, sessile cells were stained with CV after 24 h incubation at 37°C .

The results revealed that ATCC 19606, CI 232, and CI 224 strains are weak biofilm producers, while CI 223, CI 226, CI 227, and CI 230 strains are moderate-biofilm producers (Table 3). None of the evaluated strains were classified as strong biofilm producers.

ID	OD _{570nm}	Coefficient of variation (%)	Biofilm production
Control	0.160 ± 0.020	12.26	-
CI 223	0.579 ± 0.033	05.77	Moderate
CI 224	0.294 ± 0.083	28.35	Weak
CI 226	0.557 ± 0.079	14.18	Moderate
CI 227	0.690 ± 0.063	09.20	Moderate
CI 230	0.605 ± 0.074	12.31	Moderate
CI 232	0.231 ± 0.025	10.85	Weak
ATCC 19606	0.201 ± 0.016	08.21	Weak

Table 3 - Characterization of biofilm production by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the reference strain ATCC 19606 on polystyrene surface. Biofilms were produced over 24 h at 37°C in sterile flat-bottomed 96-well polystyrene plates and stained with 0.1% (w/v) crystal violet aqueous solution. The stain was resolubilized in methanol and measured at 570 nm wavelength.

3.5 Established biofilms removal assay

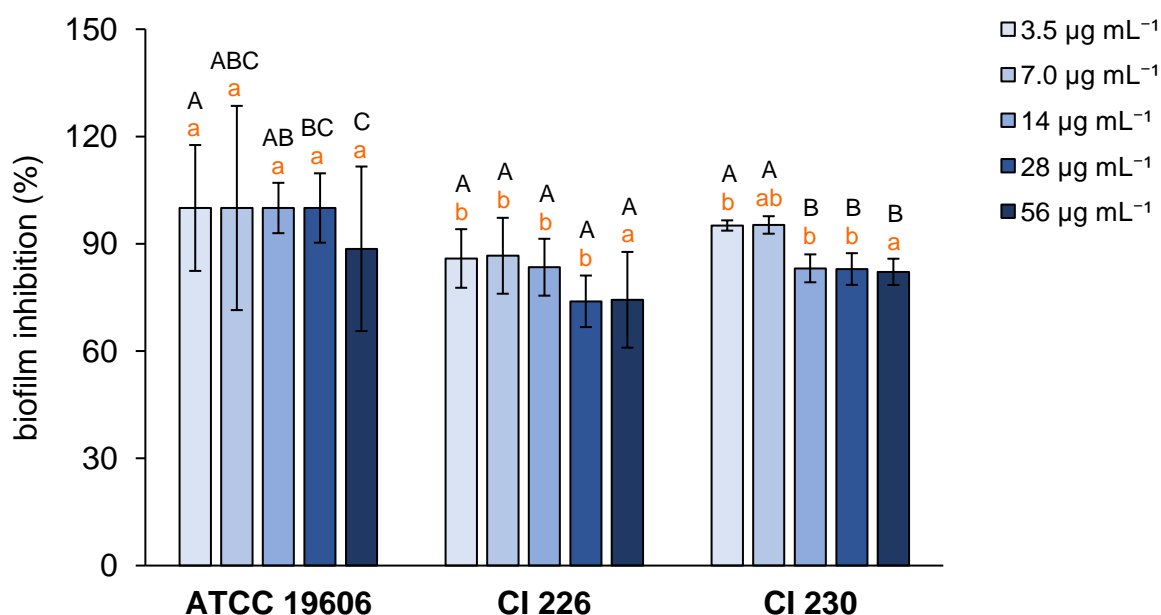
Two moderate biofilm producers *A. baumannii* CIs (226 and 230) were selected to examine established biofilm removal effects of FlpC. Results revealed that in all concentrations tested the compound promoted a biofilm biomass removal activity higher than 70% (Figure 4).

1 ATCC 19606 biofilms were eradicated in all, but 56.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration (88.59% removal).
 2 A similar effect was also observed in CIs, whereas increases in concentration did not culminate
 3 in increased biofilm removal. ANOVA indicated that the average inhibition obtained in the
 4 reference strain was not significantly different between most of the treatments ($p>0.05$).

5
 6 Higher removal of CIs biofilms occurred in 7.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (2xMIC), for both 226 (86.64%) and
 7 230 (95.25%), followed by 3.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Equal to MIC) (85.88% inhibition in CI 226 and
 8 95.10% in CI 230). These results support that low concentrations of FlpC can remove the
 9 majority of 24 h-formed biofilms of tested bacteria.

10
 11 In all treatments (capital letters), the response of CI 226 was not significantly different ($p>0.05$),
 12 and in CI 230, 3.5 and 7.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ differed from the other treatments ($p<0.05$), being the higher
 13 biofilm inhibitions obtained in this study.

14
 15 Considering a concentration-dependent response (lowercase letters), 3.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ promoted
 16 inhibition was higher in ATCC 19606, but not differed between CIs. The same was observed
 17 in 14.0 and 28.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 7.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ differed within ATCC 19606 and 226; and finally, 56.0
 18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ response was equal to all the bacteria.



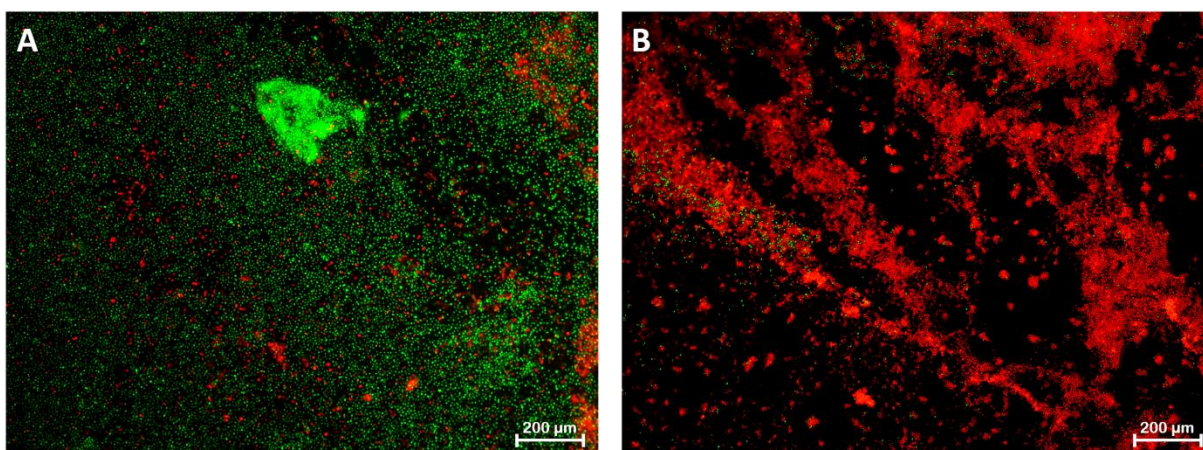
20 **Figure 4** - Effect of different concentrations of fluopsin C on established biofilms of ATCC
 21 19606 (weak biofilm producer) and the clinical isolates 226 and 230 (moderate biofilm
 22 producers) after 24 h of exposure. Capital letters indicate significant differences between
 23 treatments in the same bacteria and lowercase letters indicate significant differences between
 24 the same treatment concentration in different bacteria, both considering $p<0.05$ as significant
 25 in Tukey multiple comparison test.

26 3.6 Effect of fluopsin C on biofilm viability

27
 28
 29 Since removing biofilms (*i.e.*, reduce biofilm biomass) and killing its cells are different
 30 outcomes, 24 h-established biofilms of CI 230 were treated with 3.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of FlpC during 24
 31 h, and then stained with SYTO 9 and propidium iodide (BacLight live/dead stain). The first can

1 stain all cells exposed to it, however, propidium iodide penetrates only in cells with damaged
 2 membranes and also can promote SYTO 9 reduction, resulting in red fluorescent coloration for
 3 cells with damaged membranes, and green fluorescent to viable cells with intact membranes.

4
 5 In this experiment, a strong reduction in cell viability was observed when comparing the
 6 treatment (Figure 5B) and untreated biofilms (Figure 5A). A little number of viable cells are
 7 observed in the biofilms after treatment with the antimicrobial, and the structure seems to be a
 8 lot more disperse.



10 **Figure 5** – Effect of exposure of *Acinetobacter baumannii* CI 230 24-h biofilm to fluopsin C.
 11 Fluorescence microscopy of (A) Biofilm not exposed to fluopsin C (Control) and (B) biofilm
 12 exposed to MIC ($3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 24 hours. Biofilm was formed on glass-coverslips and stained
 13 with BacLight live/dead bacterial viability kit. Green fluorescent cells (SYTO 9 stain) represent
 14 cells without membrane damages, while red fluorescent cells (propidium iodide stain) represent
 15 damaged membrane bacterial cells.

17 4 Discussion

18
 19 The intrinsic resistance profiles of *A. baumannii* reduces the number of possibilities in antibiotic
 20 therapy. Added to antimicrobial resistance development and protective mechanisms, such as
 21 biofilm formation, very few options for treating infections and avoid bacteria spread are
 22 available and effective.

23
 24 Carbapenem-based therapy is the first line for treatment of MDR *A. baumannii* infections,
 25 however, CR strains have been considerably increasing in the past years, leaving polymyxins
 26 B and E (colistin), and tigecycline as last resort therapeutical options (Kim *et al.*, 2014;
 27 Garnacho-Montero and Timsit, 2019). Crucially, emerging resistance to these compounds, the
 28 nephrotoxicity promoted by the polymyxins, and lack of evidence of tigecycline effectiveness
 29 jeopardize clinical outcomes. In this scenario, is possible to propose that some emerging *A.*
 30 *baumannii* strains are resistant to all available antimicrobials (pan drug-resistant) (Lenhard *et*
 31 *al.*, 2017).

32
 33 Prior studies of our group have indicated *in vitro* efficiency of the secondary metabolite FlpC,
 34 purified from *P. aeruginosa* LV strain supernatant, against both Gram-negative and Gram-
 35 positive human pathogens such KPC-producing *K. pneumoniae* kpn-19 (MIC = $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$),
 36 methicillin-resistant *S. aureus* N315 (MIC = $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$), *S. aureus* BEC9393 (MIC = $1.0 \mu\text{g}$

1 mL⁻¹), and vancomycin-resistant *E. faecium* VRE-170 (MIC = 1.0 µg mL⁻¹), respectively
2 (Navarro *et al.*, 2019; 2020).

3
4 In this study, we investigate the efficacy of FlpC against XDR *A. baumannii* planktonic and
5 sessile cells. MICs for planktonic cells were equal to 3.5 µg mL⁻¹ for all CIs, while for ATCC
6 19606 strain the MIC value of 1.75 µg mL⁻¹ was identified. These results are in accordance with
7 Gionco (2016) that evidenced MICs of 7.8 µg mL⁻¹ for CR *A. baumannii* (*bla_{oxa-23}*; *bla_{oxa-58}*;
8 *bla_{oxa-72}*; *bla_{oxa-143}*; *bla_{oxa-231}*) and 3.9 µg mL⁻¹ to the more susceptible strain Ac S171/5 using
9 the F3d fraction, a semi-purified fraction obtained through vacuum liquid chromatography
10 (VLC) and composed by approximately 30% FlpC (Oliveira *et al.*, 2016).

11
12 Gionco (2016) also describes a synergistic effect between F3d associated with PolB to all tested
13 strains, even those resistant to PolB. Although the combination of FlpC and PolB resulted in an
14 additive antibacterial effect, at least a two-fold decrease in PolB MIC value was observed for
15 *A. baumannii* in the present study. Also, we highlight that concentration required for PolB
16 effectiveness was lower when combined with FlpC what can indicate a potential effective
17 combination regimen.

18
19 FlpC and PolB act on bacterial membranes (Navarro *et al.*, 2020; Trimble *et al.*, 2016), and is
20 possible that the common targets explain the additive effect observed. In contrast, F3d is a semi-
21 purified fraction and contains other molecules produced by the LV strain. We hypothesize that
22 the presence of these compounds may be responsible for the synergistic effect, once they could
23 enhance antibacterial activity, by acting on multiple targets. In this sense, we believe that
24 combining FlpC with antibiotics that act on different bacterial structures (or processes) than the
25 membranes, could provide combinations regimens that present synergistic effects.

26
27 Regarding natural products used in experimental screenings for antibiofilm activity against *A.*
28 *baumannii* strains, we highlight that they are often related to plant-derived compounds, as
29 myrtenol (Selvaraj *et al.*, 2020), methanolic extract of *Actinidia deliciosa* (Tiwari *et al.*, 2017),
30 *Mentha pulegium* L essential oil (Tutar *et al.*, 2016) and cinnamaldehyde (Mohamed *et al.*,
31 2018).

32
33 Antimicrobial peptides (AMPs) derived from animals have also been reported as promisor
34 antibiofilm agents against *A. baumannii*, as melittin, a component of *Apis mellifera* venom
35 (Rangel *et al.*, 2020), when combined with colistin (Bardbari *et al.*, 2018); and Magainin 2, that
36 can be isolated from frog skin (Kim *et al.*, 2018). Phage therapy strategies against biofilms are
37 also being evaluated in CR-strains (Vukotic *et al.*, 2020).

38
39 The inhibitory effect of microbial metabolites against *A. baumannii* biofilms has been poorly
40 explored and even less is known about FlpC effects on these bacterial communities. Previous
41 studies of our group showed that a semi-purified fraction, obtained from the supernatant of *P.*
42 *aeruginosa* LV strain, containing FlpC, decreased the production of exopolysaccharides by the
43 phytopathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain (Oliveira *et al.*, 2011). Additionally, the
44 F3d fraction inhibited the biofilms of KPC-producing *K. pneumoniae*, decreasing the number
45 and viability of sessile cells, as well the presence of extracellular material, in addition to
46 prominent morphological changes (Kerbaui *et al.*, 2016). Lastly, the same fraction also
47 inhibited established biofilms of vancomycin-resistant *E. faecium* isolates (Amichi, 2015).

48
49 Not only is effective against planktonic cells alone, or in combination with PolB, but here we
50 also examined the effects of the compound in established biofilms of XDR *A. baumannii* strains,

1 in which the compound presented strong removal capacity (>70% in all treatments) while also
2 promoted cell-infeasibility at a concentration of $3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, which happens to be the MIC for
3 the compound in planktonic cells. These results reinforce the potential of FlpC as an
4 antimicrobial and antibiofilm agent, once biofilms can enhance antibiotic resistance between
5 10-1000 folds (Reffuveille *et al.*, 2014; Penesyan *et al.*, 2019).

6
7 Studies with FlpC have suggested that this secondary metabolite is a great candidate for new
8 antimicrobial drug development, and progressively, its effectiveness against a large repertoire
9 of human and vegetal pathogens is being investigated.

10 **5. Conclusions**

11
12 FlpC demonstrated to be effective against planktonic cells of XDR *A. baumannii* CIs alone or
13 in combination with PolB, resulting in an additive effect that increases the pathogen
14 susceptibility to the commercial antimicrobial, even for the formerly resistant isolates with
15 higher MICs.

16
17 Established biofilms of XDR CIs of *A. baumannii* are also highly affected by FlpC exposure,
18 which promotes decreases in cell number and viability, additionally to structural dispersion at
19 low concentrations (MIC and 2xMIC).

20
21 Based on the experimental data and prior studies of our group, FlpC can be considered an
22 effective antimicrobial agent against XDR *A. baumannii* planktonic and biofilm cells, and we
23 consider the compound as a promising candidate for new drug development and also a
24 component of disinfectants agents to enhances the removal of pathogens from objects and
25 surfaces.

26 **Funding**

27
28 This research was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological
29 Development (CNPq) 439754/2018-6 registered project, Coordination for the Improvement of
30 Higher Education Personnel (CAPES), and Araucaria Foundation.

31 **Acknowledgments**

32
33 We thank the funding agencies CNPq, CAPES, and Araucaria Foundation for granting student
34 scholarships and research fellowship. We also thank the Laboratory of Microscopy and
35 Microanalysis (LMEM, UEL/FINEP) for assistance in fluorescence microscopy analysis; and
36 Dr. Elaine Floristher Carrara-Marroni of the Laboratory of Clinical Microbiology from the
37 University Hospital of State University of Londrina, for kindly providing the clinical isolates
38 used in this study.

39 **References**

40
41 Amichi, D. P. (2015). *Antibiotic activity of secondary metabolite produced by Pseudomonas*
42 *aeruginosa in planktonic cells and Enterococcus faecium biofilm*. Dissertation. Londrina (PR):
43 State University of Londrina.
44
45
46
47

- 1 Andrade, G. (2008). Processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com
2 atividades antibióticas para o controle de doenças causadas por bactérias em plantas. *BR PI*
3 *0803350-1*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).
- 4 Bardbari, A. M., Arabestani, M. R., Karami, M., Keramat, F., Aghazadeh, H., Alikhani, M. Y.,
5 *et al.* (2018). Highly synergistic activity of melittin with imipenem and colistin in biofilm
6 inhibition against multidrug-resistant strong biofilm producer strains of *Acinetobacter*
7 *baumannii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37,443-454. doi: 10.1007/s10096-018-3189-7
- 8 Bedoya, J. C., Dealis, M. L., Silva, C. S., Niekawa, E. T. G., Navarro, M. O. P., Simionato, A.
9 S., *et al.* (2019). Enhanced production of target bioactive metabolites produced by
10 *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 17, 653–664. doi:
11 10.1016/j.bcab.2018.12.024
- 12 Cardozo, V. F., Oliveira, A. G., Nishio, E. K., Perugini, M. R. E., Andrade, C. G. T. J., Silveira,
13 W. D., *et al.* (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas*
14 strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann. Clin. Microbiol.*
15 *Antimicrob.* 12:12. doi: 10.1186/1476-0711-12-12
- 16 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). *M07-A9 document: methods for*
17 *dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. 9th ed. Wayne,
18 PA: CLSI.
- 19 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018). *M02 document: performance*
20 *standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. 13th ed. Wayne, PA: CLSI.
- 21 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2020). *M100 document: performance*
22 *standards for antimicrobial susceptibility testing*. 30th. ed. Wayne, PA: CLSI.
- 23 Egawa, Y., Umino, K., Awataguchi, S., Kawano, Y., and Okuda, T. (1970). Antibiotic YC 73 of
24 *Pseudomonas* origin. I. Production, isolation and properties. *J. Antibiot.* 23:6, 267-270. doi:
25 10.7164/antibiotics.23.267
- 26 Garnacho-Montero, J., and Timsit, J. F. (2019). Managing *Acinetobacter baumannii* infections.
27 *Curr. Opin. Infect. Dis.* 32:1, 69-76. doi: 10.1097/qco.0000000000000518
- 28 Gionco, B. (2016). *Organometallic antibiotic producer Pseudomonas aeruginosa LV strain:*
29 *transcriptome analysis in copper presence and antibacterial activity in multidrug-resistant*
30 *Acinetobacter baumannii* isolates. Dissertation. Londrina (PR): State University of Londrina.
- 31 Gionco, B., Tavares, E. R., Oliveira, A. G., Yamada-Ogatta, S. F., Carmo, A. O., Pereira, U. P., *et*
32 *al.* (2017). New insights about antibiotic production by *Pseudomonas aeruginosa*: a gene
33 expression analysis. *Front. Chem.* 5:66. doi: 10.3389/fchem.2017.00066
- 34 Greene, C., Wu, J., Rickard, A. H., and Xi, C. (2016). Evaluation of the ability of *Acinetobacter*
35 *baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.*
36 63:4, 233-239. doi: 10.1111/lam.12627
- 37 Kakkar, R., Dua, A., and Gahlot, P. (2007). Metal ion complexes of thioformin: a density
38 functional study. *Polyhedron* 26, 5301-5308. doi: 10.1016/j.poly.2007.07.049

- 1 Kerbauy, G., Vivan, A. C. P., Simões, G. C., Simionato, A. S., Pelisson, M., Vespero, E. C., *et al.*
2 (2016). Effect of a metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella*
3 *pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 17:4.
4 doi: 10.2174/138920101704160215171649
- 5 Kim, M. K., Kang, N. H., Ko, S. J., Park, J., Park, E., Shin, D. W., *et al.* (2018). Antibacterial
6 and antibiofilm activity and mode of action of magainin 2 against drug-resistant *Acinetobacter*
7 *baumannii*. *Int. J. Mol. Sci.* 19:3041. doi: 10.3390/ijms19103041
- 8 Kim, U. J., Kim, H. K., An, J. H., Cho, S. K., Park, K., and Jang, H. (2014) Update on the
9 epidemiology, treatment, and outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter* infections.
10 *Chonnam Med. J.* 50, 37-44. doi: 10.4068/cmj.2014.50.2.37
- 11 Lenhard, J. R., Thamlikitkul, V., Silveira, F. P., Garonzik, S. M., Tao, X., Forrest, A., *et al.*
12 (2017). Polymyxin-resistant, carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* is eradicated by a
13 triple combination of agents that lack individual activity. *Antimicrob. Chemother.* 72, 1415–
14 1420. doi: 10.1093/jac/dkx002
- 15 Leong, J. and Bell, S.J. (1978). Coordination isomers of antibiotic thiohydroxamate-metal
16 complexes geometrical isomers of tris(N-methylthioformohydroxamato)rhodium(III) and bis(N-
17 methylthioformohydroxamato)platinum(II). *Inorg. Chem.* 17:7, 1886-1892. doi:
18 10.1021/ic50185a038
- 19 Lin, M. F., and Lan, C. Y. (2014). Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from
20 bench to bedside. *World J. Clin. Cases.* 2:12, 787-814. doi: 10.12998/wjcc.v2.i12.787
- 21 Ma, L., Jiang, C., Cui, M., Lu, R., Liu, S., Zheng, B., *et al.* (2013). Fluopsin C induces oncosis of
22 human breast adenocarcinoma cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 34, 1093–1100. doi:
23 10.1038/aps.2013.44
- 24 Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., *et al.*
25 (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an
26 international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin.*
27 *Microbiol. Infect.* 18:3, 268-281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- 28 Mohamed, S. H., Salem, D., Azmy, M., and Fam, N. S. (2018). Antibacterial and antibiofilm
29 activity of cinnamaldehyde against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Egypt: in
30 vitro study. *J. Appl. Pharm. Sci.* 8:11, 151-156. doi: 10.7324/JAPS.2018.81121
- 31 Navarro, M. O. P., Dilarri, G., Simionato, A. S., Grzegorzczuk, K., Dealis, M. L., Cano, B. G.,
32 *et al.* (2020). Determining the targets of fluopsin C action on Gram-negative and Gram-positive
33 bacteria. *Front. Microbiol.* 11:1076. doi: 10.3389/fmicb.2020.01076
- 34 Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., Pérez, J. C. B., Barazetti, A. R., Emiliano, J., Niekawa, E. T.
35 G., *et al.* (2019). Fluopsin C for treating multidrug-resistant infections: *in vitro* activity against
36 clinically important strains and *in vivo* efficacy against carbapenemase-producing *Klebsiella*
37 *pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 10:2431. doi: 10.3389/fmicb.2019.02431
- 38 Oliveira, A. G., Spago, F. R., Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., Silva, C. S., Barazetti, A.
39 R., *et al.* (2016). Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits
40 the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front. Microbiol.* 7:113. doi:
41 10.3389/fmicb.2016.00113

- 1 Otsuka, H., Niwayama, S., Tanaka, H., Take, T., Uchiyama, T., Nakazawa, H., *et al.* (1972). An
2 antitumor antibiotic, no. 4601 from *Streptomyces*, identical with YC 73 of *Pseudomonas* origin. *J.*
3 *Antibiot.* 25:6, 369-370. doi: 10.7164/antibiotics.25.369
- 4 Penesyanyan, A., Nagy, S. S., Kjelleberg, S., Gillings, M. R., and Paulsen, I. T. (2019). Rapid
5 microevolution of biofilm cells in response to antibiotics. *npj Biofilms and Microbiomes.* 34.
6 doi: 10.1038/s41522-019-0108-3
- 7 Pistori, J. F., Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., Andreatta, M. F. L., Santos, I. M. O., Meneguim,
8 L., *et al.* (2018). Low-molecular-weight metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* as an
9 alternative to control huanglongbing in *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Trop. Plant Pathol.* 43, 289-
10 296. doi: 10.1007/s40858-018-0231-3
- 11 Pitts, B., Hamilton, M. A., Zilver, N., and Stewart, P. S. (2003). A microtiter-plate screening
12 method for biofilm disinfection and removal. *J. Microbiol. Methods.* 54:2, 269-276. doi:
13 10.1016/S0167-7012(03)00034-4
- 14 Rampazo, L. G. L. (2004). *Evaluation of the effect of biological agents and their products into*
15 *the incidence of citrus canker lesions.* Dissertation. Londrina (PR): State University of
16 Londrina.
- 17 Rangel, K., Lechuga, G. C., Souza, A. L. A., Carvalho, J. P. R. S., Bôas, M. H. S. V., and
18 Simone, S. G. (2020). Pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii*, but not other strains, are
19 resistant to the bee venom peptide melittin. *Antibiotics.* 9:178. doi: 10.3390/antibiotics9040178
- 20 Reffuveille, F., Fuente-Núñez, C., Mansour, S., and Hancock, R. E. W. (2014). A broad-
21 spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrob.*
22 *Agents. Chemother.* 58:9, 5363–5371. doi: 10.1128/AAC.03163-14
- 23 Selvaraj, A., Valliammai, A., Sivasankar, C., Suba, M., Sakthivel, G., and Pandian, S. K.
24 (2020). Antibiofilm and antivirulence efficacy of myrtenol enhances the antibiotic
25 susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. *Sci. Rep.* 10:21975. doi: 10.1038/s41598-020-
26 79128-x
- 27 Shirahata, K., Deguchi, T., Hayashi, T., Matsubara, I., and Suzuki, T. (1970). The structures of
28 fluopsins C and F. *J. Antibiot.* 23:11, 546-550. doi: 10.7164/antibiotics.23.546
- 29 Sopirala, M. M., Mangino, J. E., Gebreyes, W. A., Biller, B., Bannerman, T., Balada-Llasat, J.
30 M., *et al.* (2010). Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods
31 for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 54:11, 4678-
32 4683. doi: 10.1128/AAC.00497-10
- 33 Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., *et al.* (2007).
34 Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical
35 recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 115, 891-
36 899. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- 37 Sultan, A. M., and Seliem, W. A. (2018). Identifying risk factors for healthcare-associated
38 infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive
39 care unit. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 18:1, 75-80. doi: 10.18295/squmj.2018.18.01.012

- 1 Tiwari, V., Tiwari, D., Patel, V. and Tiwari, M. (2017). Effect of secondary metabolite of
2 *Actinidia deliciosa* on the biofilm and extra-cellular matrix components of *Acinetobacter*
3 *baumannii*. *Microb. Pathog.* 110, 345-351. doi: 10.1016/j.micpath.2017.07.013
- 4 Trimble, M. J., Mlynářčík, P., Kolář, M., and Hancock, R. E.W. (2016). Polymyxin: alternative
5 mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6:10. doi:
6 10.1101/cshperspect.a025288
- 7 Tutar, U., Çelik, C., Karaman, I., Ataş, M., and Hepokur, C. (2016). Anti-biofilm and
8 antimicrobial activity of *Mentha pulegium* L essential oil against multidrug-resistant
9 *Acinetobacter baumannii*. *Trop. J. Pharm. Res.* 15:5, 1039-1046. doi: 10.4314/tjpr.v15i5.20
- 10 Valencia-Martín, R., Gonzalez-Galan, V., Alvarez-Marín, R., Cazalla-Foncueva, A. M.,
11 Aldabó, T., Gil-Navarro, M. V., *et al.* (2019). A multimodal intervention program to control a
12 long-term *Acinetobacter baumannii* endemic in a tertiary care hospital. *Antimicrob. Resist.*
13 *Infect. Control.* 8:199. doi: 10.1186/s13756-019-0658-4
- 14 Vukotic, G., Obradovic, M., Novovic, K., Di Luca, M., Jovicic, B., Fira, D., *et al.* (2020).
15 Characterization, antibiofilm, and depolymerizing activity of two phages active on
16 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Front. Med.* 7:426. doi:
17 10.3389/fmed.2020.00426
- 18 Wenderska, I. B., Chong, M., McNulty, J., Wright, G. D., and Burrows, L. L. (2011). Palmitoyl-
19 dl-Carnitine is a multitarget inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development.
20 *ChemBioChem.* 12:18, 2759-2766. doi: 10.1002/cbic.201100500
- 21 World Health Organization (WHO) (2017). *Prioritization of pathogens to guide discovery,*
22 *research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including*
23 *tuberculosis*. Geneva, CH: WHO.

1 **Supplementary material**

2

3 **Table S1** - Numeric values obtained on biofilm removal assays in different concentrations of
 4 fluopsin C (24 hours exposal) against the reference strain ATCC 19606 and XDR clinical
 5 isolates 226 and 230 of *Acinetobacter baumannii*.

FlpC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ATCC 19606		CI 226		CI 230	
	INHIBITION (%)	CV (%)	INHIBITION (%)	CV (%)	INHIBITION (%)	CV (%)
3.5	174.26 \pm 17.60	10.10	85.88 \pm 08.19	09.54	95.10 \pm 01.44	01.51
7.0	136.62 \pm 28.56	20.90	86.64 \pm 10.62	12.25	95.25 \pm 02.45	02.57
14.0	143.38 \pm 07.04	04.91	83.44 \pm 07.95	09.53	83.13 \pm 03.90	04.69
28.0	117.32 \pm 09.70	08.27	73.91 \pm 07.21	09.75	82.94 \pm 04.42	05.33
56.0	088.59 \pm 23.01	25.97	74.32 \pm 13.39	18.02	82.14 \pm 03.68	04.48

6

1 CONCLUSÃO

2 A FlpC demonstrou ser efetiva contra células planctônicas de isolados
3 clínicos de *A. baumannii* XDR quando utilizada sozinha ou combinada PolB, com a
4 qual compartilha efeito aditivo, potencializando a suscetibilidade do patógeno ao
5 antimicrobiano comercial, mesmo frente aos isolados mais resistentes.

6 Biofilmes preestabelecidos das respectivas bactérias também foram
7 altamente afetados pela exposição à FlpC, tendo grandes porcentagens de sua
8 biomassa removidas e redução da viabilidade das células remanescentes,
9 adicionalmente à dispersão da estrutura em concentrações muito baixas do composto.

10 Baseado nos dados experimentais obtidos, a FlpC pode ser
11 considerada um potente agente antimicrobiano contra ambas as células planctônicas
12 e sésseis. Nós consideramos este composto como um candidato promissor ao
13 desenvolvimento de um novo fármaco antimicrobiano, e também, como componente
14 de formulações desinfetantes, potencializando a remoção de patógenos aderidos a
15 objetos e superfícies.

16