



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MICKELY LIUTI DEALIS GOMES

**FLUOPSINA C LIPOSSOMAL: PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS, EFEITO CITOTÓXICO E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA CONTRA *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
MULTIRRESISTENTE *IN VITRO* E *IN VIVO***

Londrina, Paraná
2025

MICKELY LIUTI DEALIS GOMES

**FLUOPSINA C LIPOSSOMAL: PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS, EFEITO CITOTÓXICO E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA CONTRA *Klebsiella pneumoniae*
MULTIRRESISTENTE *IN VITRO* E *IN VIVO***

Trabalho de Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutorado em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça

Londrina
2025

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

Gomes, Mickely Liuti Dealis.

Fluopsina C lipossomal: propriedades físico-químicas, efeito citotóxico e atividade antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae* multirresistente in vitro e in vivo / Mickely Liuti Dealis Gomes. - Londrina, 2025.
86 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade.

Coorientador: Luís Fernando Cabeça.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2025.

Inclui bibliografia.

1. Resistência antibacteriana - Tese. 2. Produto Natural - Tese. 3. Antimicrobianos - Tese. 4. Encapsulamento - Tese. I. Andrade, Galdino. II. Cabeça, Luís Fernando. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579

MICKELY LIUTI DEALIS GOMES

**FLUOPSINA C LIPOSSOMAL: PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS, EFEITO CITOTÓXICO E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA CONTRA *Klebsiella pneumoniae*
MULTIRRESISTENTE *IN VITRO* E *IN VIVO***

Trabalho de Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutorado em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a Marcia Regina Eches Perugini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Martha Viviana Torres Cely
Universidade Federal do Mato Grosso - UFMG

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 25 de março de 2025.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por me guiar e iluminar em todos os momentos da minha trajetória acadêmica, me mantendo focada em meu objetivo. Também serei eternamente grata aos meus pais e meu marido por sonharem junto comigo e me apoiarem em momentos de incerteza.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Galdino Andrade e meu co-orientador professor Dr. Luís Fernando Cabeça, por toda ajuda em minha trajetória, não apenas no doutorado, mas desde a graduação e mestrado. Da mesma forma, agradeço aos meus amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, por toda alegria e apoio que me deram ao longo desses anos.

Agradeço a CAPES, CNPQ (Projeto nº 439754/2018-6) e PPSUS pelo financiamento deste trabalho e tanto outros. Também agradeço ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina, à professora Dr.^a Sueli Fumie Yamada Ogatta e Dr.^a Patrícia Moraes Lopes Pereira do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos e ao professor Dr. Fábio Goulart de Andrade e seus orientandos do Departamento de Histologia da mesma Universidade por todo direcionamento durante os experimentos. Também agradeço a todos do Laboratório de Biomateriais e Biomoléculas Orgânicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, assim como ao professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello ao disponibilizar seu laboratório de Experimentação Animal no Departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá.

Todo apoio é essencial durante uma jornada e, certamente, cada um dos citados acima e muitos outros indiretamente, fizeram possível que eu pudesse chegar a este momento da minha história.

Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança!

Mais uma vez
(Renato Russo)

GOMES, Mickely Liuti Dealis. **Fluopsina C lipossomal: propriedades físico-químicas, efeito citotóxico e atividade antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae* multirresistente *in vitro* e *in vivo***. 2025. 86p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

RESUMO

A Fluopsina C (Flp) é um antimicrobiano de amplo espectro descoberto há cinco décadas e seu uso desencorajado devido à alta toxicidade. Para viabilizar seu uso clínico, esse trabalho objetivou a otimização da Flp por lipossomas. A Flp foi purificada do sobrenadante de cultura em presença de cobre de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV com posterior purificação utilizando diversos métodos cromatográficos padronizados. O encapsulamento lipossomal foi obtido via extrusão contando com a formulação de fosfatidilcolina de soja, colesterol e diesteroil fosfatidil etanolamina (DSPE)-polietilenoglicol (PEG) em diferentes proporções formando quatro formulações iniciais, também com variações quanto a presença de dimetilsulfóxido (DMSO). As formulações foram avaliadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação, estabilidade de armazenamento, taxa de liberação em sistema *in vitro*, citotoxicidade e atividade antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae* multirresistente (MDR) *in vitro* e em modelo de infecção de corrente sanguínea *in vivo* em camundongos Swiss. Os resultados indicam que a formulação DSPE-PEG DMSO+Flp apresentou estabilidade físico-química, além de atividade antimicrobiana semelhante a Flp livre, com vantagens quanto à liberação controlada e citotoxicidade reduzida da concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) em 54% nos testes *in vitro*. Não houve mortalidade na maior dose administrada, sendo possível inferir uma dose letal maior que 8 mg/kg. A melhor dose efetiva *in vivo* foi de 2 doses de 2 mg/kg para Flp livre frente 1 dose de 2 mg/kg para DSPE-PEG DMSO+Flp, com 40% de redução da mortalidade. Não foi observada hemorragia hepática, apenas infiltração inflamatória discreta. A avaliação dos rins apresentou necrose discreta a moderada, contudo não houve presença de infiltrado inflamatório e hemorragia em nenhum dos grupos analisados. Os órgãos analisados também apresentaram tendência de recuperação dos parâmetros normais ao longo dos tempos estudados. Dessa forma, a encapsulação em lipossomas pode viabilizar o uso da mesma para o controle de infecções causadas por *K. pneumoniae* MDR.

Palavras-chave: Resistência antibacteriana, Produto natural, Antimicrobianos, Encapsulamento.

GOMES, Mickely Liuti Dealis. **Liposomal Fluopsin C: physicochemical properties, cytotoxic effect and antibacterial activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae in vitro and in vivo***. 2025. 86p. Thesis (Doctorate's degree in Microbiology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

ABSTRACT

Fluopsin C (Flp) is a broad-spectrum antimicrobial discovered five decades ago and its use has been discouraged due to its high toxicity. To enable its clinical use, this study aimed to optimize Flp by liposomes. Flp was purified from the culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa* strain LV in the presence of copper, with subsequent purification using several standardized chromatographic methods. Liposomal encapsulation was obtained by extrusion using the formulation of soybean phosphatidylcholine, cholesterol and diesteroyl phosphatidyl ethanolamine (DSPE)-polyethylene glycol (PEG) in different proportions, forming four initial formulations, also with variations in the presence of dimethyl sulfoxide (DMSO). The formulations were evaluated for size, polydispersity index, zeta potential, encapsulation efficiency, storage stability, release rate in an *in vitro* system, cytotoxicity and antimicrobial activity against multidrug-resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae in vitro and in vivo* bloodstream infection model in Swiss mice. The results indicate that the DSPE-PEG DMSO+Flp formulation presented physicochemical stability, in addition to antimicrobial activity similar to free Flp, with advantages regarding controlled release and reduced cytotoxicity of the 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) by 54% in *in vitro* tests. There was no mortality at the highest dose administered, and it is possible to infer a lethal dose greater than 8 mg/kg. The best effective dose *in vivo* was 2 doses of 2 mg/kg for free Flp versus 1 dose of 2 mg/kg for DSPE-PEG DMSO+Flp, with a 40% reduction in mortality. No hepatic hemorrhage was observed, only mild inflammatory infiltration. The kidneys showed mild to moderate necrosis, but there was no presence of inflammatory infiltrate or hemorrhage in any of the groups analyzed. The organs analyzed also showed a tendency to recover normal parameters over the time studied. Thus, liposome encapsulation may enable its use for the control of infections caused by MDR *K. pneumoniae*.

Key-words: Antibacterial resistance, Natural product, Antimicrobials, Encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Número de casos reportados de infecções na corrente sanguínea (em azul) e infecções com reporte de resistência antimicrobiana (em amarelo) ao longo dos anos (2016-2020) para países participantes do GLASS. (a) Total de casos reportados; (b) casos reportados de *K. pneumoniae* resistente à carbapenêmicos; (c) casos reportados de *K. pneumoniae* resistente à cefalosporinas de terceira geração.36
- Figura 2** – Fluopsina C. (A) Microscopia eletrônica de cristais de Fluopsina C; (B) estrutura molecular da Fluopsina C.....39
- Figura 3** – Histórico de estudos relacionados com a Fluopsina C.....40
- Figura 4** – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células de *C. auris* depois de 24 horas sem tratamento (a) e tratadas com 3,12µg/mL de F4a, fração semipurificada de Fluopsina C. Núcleo (N); vacúolo (V); mitocôndria (M); desorganização citoplasmática (seta vermelha); descolamento da membrana celular (seta preta).42
- Figura 5** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de células de *K. pneumoniae* tratadas com Fluopsina C após 1 hora de exposição, evidenciando pontos de depressões na forma celular bacteriana.....42
- Figura 6** – Representação esquemática da bicamada lipossomal47
- Figura 7** – Representação esquemática dos principais estágios do método de hidratação de película fina de preparação de lipossomas. Os componentes lipídicos são dissolvidos em solvente orgânico (A); após a evaporação do solvente, uma película lipídica seca (fina) é formada (B). A película é então reidratada em um tampão salino causando um inchaço das bicamadas lipídicas (C), por fim, a agitação da amostra favorece a formação de vesículas multilamelares (D)48
- Figura 8** – Categorias lipossomais de acordo com estrutura interna e tamanho da vesícula. SUVs: pequenas vesículas unilamelares; LUVs: vesículas unilamelares grandes; OLVs: vesículas oligolamelares; MLVs: vesículas multilamelares; MVLs: lipossomas multivesiculares; GUVs: vesículas unilamelares gigantes.50
- Figura 9** – Possibilidades de modificações da superfície lipossomal.51

- Figura 10** –Interação lipossomal com a bicamada lipídica celular. **A:** fusão dos lipídios lipossomais com os da membrana celular, liberando o conteúdo no interior celular. **B:** na adsorção os lipossomas são atraídos para a membrana celular por forças eletrostáticas promovendo a liberação do conteúdo. **C:** troca lipídica entre lipídios da membrana lipossomal e celular. **D:** pela endocitose as células fagocitárias envolvem o lipossoma e após sua destruição o conteúdo é liberado.....55
- Figura 11** –Interação lipossomal com *P. aeruginosa* vista por Microscopia eletrônica.....56
- Figura 12** –Quimioterapia convencional (à esquerda) versus encapsulada em lipossomas (à direita), beneficiando-se do Efeito de Permeabilidade de Retenção, em tecido saudável e tumoral.57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>Accelerated Blood Clearance</i> (Limpeza Acelerada do Sangue)
CC ₅₀	Concentração Citotóxica de 50%
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CRE	<i>Carbapenem-resistant Enterobacterales</i> (Enterobacterales resistente a Carbapenêmicos)
CuNPs	Nanopartículas de cobre
DL ₅₀	Dose Letal de 50%
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento Dinâmico da Luz)
DSPE	Diestearoil fosfatidil etanolamina
EMA	<i>European Medical Agency</i> (Agência Médica Europeia)
EPR	Efeito de Permeabilidade de Retenção
ESBL	β -Lactamases de Espectro Estendido
ESKAPEE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp., Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos)
GLASS	<i>Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System</i> (Sistema Mundial de Vigilância da Resistência e da Utilização dos Antimicrobianos)
GUVs	<i>Giant unilamellar vesicles</i> (Vesículas unilamelares gigantes)
hvKp	<i>K. pneumoniae</i> hipervirulenta
ICS	Infecção de corrente sanguínea
KPC	<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase

LPS	Lipopolissararídeos
LUVs	<i>Large unilamellar vesicles</i> (Vesículas unilamelares grandes)
LV	Lesão Velha
MBL	Metalo- β -lactamases
MDR	<i>Multidrug resistant</i> (Resistente à múltiplas drogas)
MDR-Kp	<i>Multidrug resistant K. pneumoniae</i> (<i>K. pneumoniae</i> multirresistente)
MHPA	<i>Medicines and Healthcare Products Agency</i> (Agência de Medicamentos e Produtos de Saúde)
MLVs	<i>Multilamellar vesicles</i> (Vesículas multilamelares)
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina)
MVLs	<i>Multivesicular liposomes</i> (Lipossomas multivesiculares)
NDM	<i>New Delhi metallo-β-lactamase</i> (Metalo- β -lactamase de Nova Deli)
OAC	<i>Organocupric Antimicrobial Compound</i> (Composto Antimicrobiano Organocúprico)
OLVs	<i>Oligolamellar vesicles</i> (Vesículas oligolamelares)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinas
PDR	<i>Pandrug resistant</i> (Pan-resistente à medicamentos)
PEG	Polietilenoglicol
PEG-DSPE	Polietilenoglicol associado a diesteroil folfatidil etolamina
SFM	Sistema Fagocitário Mononuclear
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SPC	<i>Soy phosphatidylcholine</i> (Fosfatidilcolina de soja)
RA	Resistência Antimicrobiana
SUV	<i>Small unilamellar vesicles</i> (Vesículas unilamelares pequenas)
UEL	Universidade Estadual de Londrina

UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
VRE	<i>Vancomycin-resistant Enterococcus</i> (<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina)
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i> (Extensivamente resistente à medicamentos)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS	18
3.2	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	19
3.3	ENTEROBACTÉRIAS E RESISTÊNCIA AOS B-LACTÂMICOS	25
3.3.1	<i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	28
3.3.1.1	INFECÇÃO DE CORRENTE SANGUÍNEA (ICS) E SEPSE	34
3.4	Fluopsina C	38
3.4.1	Atividade antimicrobiana do Cobre	44
3.5	DRUG DELIVERY SYSTEMS	46
3.5.1	LIPOSSOMAS	46
	REFERÊNCIAS	59
4	ARTIGO	69
	“Liposomal Fluopsin C: physicochemical properties, cytotoxicity, and antibacterial activity <i>in vitro</i> and over <i>in vivo</i> MDR <i>Klebsiella pneumoniae</i> bacteremia model.”	69
5	CONCLUSÃO	86

1 1 INTRODUÇÃO

2 Entre as infecções causadas por microrganismos resistentes à
3 múltiplas drogas (MDR), a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou as
4 Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos (CRE), incluindo *Klebsiella*
5 *pneumoniae*, como críticas em termos de urgência para o desenvolvimento de novos
6 antimicrobianos (WHO, 2017, WHO, 2024). Além disso, *K. pneumoniae* está
7 particularmente associada a infecções graves da corrente sanguínea e pneumonia
8 secundária em pacientes com infecções respiratórias virais (Kochan *et al.*, 2022).

9 Os termos consenso globais em relação a resistência antimicrobiana:
10 MDR, XDR (extensivamente resistente à medicamentos) e PDR (pan-resistente à
11 medicamentos), surgiram em 2012 afim de harmonizar as nomenclaturas com
12 finalidade clínica e científica (Magiorakos *et al.*, 2012). Segundo os autores, MDR é
13 definida como “não suscetibilidade a pelo menos um agente em três ou mais
14 categorias antimicrobianas”. Já XDR é definida como “não suscetibilidade a pelo
15 menos um agente em todas as categorias antimicrobianas, exceto duas ou menos”.
16 PDR é definida como “não suscetibilidade a todos os agentes em todas as categorias
17 antimicrobianas”.

18 Contudo, Rafailidis e Kofteridis (2022) propõem um refinamento e
19 atualização das definições de MDR e XDR. Dessa forma, MDR seria definida como a
20 “não suscetibilidade a pelo menos um agente em três ou mais categorias
21 antimicrobianas e até (e incluindo) o número total de todas as categorias
22 antimicrobianas menos dois”. Enquanto, XDR seria definido como “não suscetibilidade
23 a pelo menos um agente em todas as categorias antimicrobianas, exceto duas ou
24 menos (ou seja, isolados bacterianos permanecem suscetíveis a apenas uma ou duas
25 ou mesmo nenhuma categoria antimicrobiana)”. Esse artigo faz essa proposta, uma
26 vez que, a definição elaborada em 2012 não abrange a “não testagem” de todas as
27 categorias antimicrobianas, evitando também sobreposições de categorias, assim
28 como, que a falta de testagem precipitadamente considere como não-MDR ou não-
29 XDR uma cepa com testagem incompleta em relação as categorias de
30 antimicrobianos propostas (Rafailidis e Kofteridis, 2022).

31 A busca por novos antimicrobianos supressores de MDR inclui a
32 superação de abordagens atuais, como terapias combinatórias e aumento de
33 dosagem (ou seja, reformulações de uso de medicamentos já comercializados) e o

1 desenvolvimento de medicamentos com novos modos de ação (CDC, 2014; Jacobs
2 *et al.*, 2017; Da Silva e Velasquez, 2018; Sheu *et al.*, 2019; Laws, Shaaban, Rahman,
3 2019).

4 A Fluopsina C, um antimicrobiano natural de amplo espectro
5 descoberto há cerca de cinco décadas, produzido pelo metabolismo secundário de
6 *Pseudomonas* spp. e *Streptomyces* sp. quando cultivados na presença de cobre,
7 mostra eficiência contra cepas MDR, *in vitro* e *in vivo* (Cardozo *et al.*, 2013; Kerbauy
8 *et al.*, 2016; Navarro *et al.*, 2019; Afonso *et al.*, 2024). Além disso, foi observada uma
9 baixa frequência de mutantes resistentes à Fluopsina C, bem como uma atividade
10 antibiofilme eficiente (Kerbauy *et al.*, 2016; Navarro *et al.*, 2019; Afonso *et al.*, 2024).
11 No entanto, a pesquisa com o composto foi desencorajada devido à sua toxicidade e
12 propriedades farmacocinéticas precárias (Egawa *et al.*, 1970; Navarro *et al.*, 2019).
13 Contudo, vários antimicrobianos comercializados exibem citotoxicidade baixa ou
14 moderada e continuam sendo recursos essenciais para combater infecções por MDR
15 (Sharma, 2020).

16 Nesse contexto, acreditamos que o desenvolvimento de formulações
17 para a Fluopsina C pode ser a chave para minimizar seus efeitos adversos e aumentar
18 seu potencial como candidata a novo medicamento.

19 O encapsulamento lipossomal da Fluopsina C é uma estratégia
20 promissora para reduzir a citotoxicidade do composto. Esse sistema para liberação
21 controlada de medicamentos tem sido amplamente explorado em farmacologia,
22 melhorando os tratamentos para patógenos de alto risco e minimizando os efeitos
23 colaterais encontrados em formulações convencionais, como a anfotericina B e
24 doxorrubicina (Catalano *et al.*, 2022; Alarfaj *et al.*, 2022). As vantagens deste método
25 incluem o aumento dos efeitos terapêuticos por meio da liberação controlada do
26 fármaco, toxicidade reduzida, farmacocinética e solubilidade aprimoradas e redução
27 no número de doses necessárias para manter o efeito terapêutico (Li *et al.*, 2019; Khan
28 *et al.*, 2020; Catalano *et al.*, 2022; Alavi *et al.*, 2022).

29 No presente estudo, a incorporação de Fluopsina C em lipossomas foi
30 realizada para reduzir a citotoxicidade do composto, aumentar suas propriedades
31 farmacocinéticas e avaliar sua atividade antimicrobiana contra isolados clínicos de *K.*
32 *pneumoniae* tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esta abordagem visa estabelecer novas
33 opções para o uso de Fluopsina C, aumentando as propriedades do composto para o
34 desenvolvimento de um novo fármaco antimicrobiano direcionado a patógenos MDR.

1 2 OBJETIVOS

2 2.1 OBJETIVO GERAL

- 3 • Produzir, caracterizar quimicamente e avaliar as atividades antimicrobiana em *K.*
4 *pneumoniae* multirresistente, e citotóxica em células de mamíferos da Fluopsina
5 C lipossomal *in vitro* e *in vivo*.

6 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 7 • Produzir, extrair e purificar a Fluopsina C a partir do sobrenadante de cultura de
8 *P. aeruginosa* cepa LV em presença de cobre.
- 9 • Preparar vesículas lipossomais utilizando lipídios de fosfatidilcolina de soja
10 (SPC), colesterol e polietilenoglicol (PEG) ligado covalentemente à diestearoil
11 fosfatidil etanolamina (DSPE).
- 12 • Caracterizar o sistema lipossomal quanto à eficiência de encapsulamento,
13 potencial zeta, índice de polidispersão e tamanho das partículas.
- 14 • Observar via Microscopia Eletrônica de Varredura a estrutura da Fluopsina C
15 lipossomal.
- 16 • Verificar a estabilidade de armazenamento do sistema lipossomal utilizando
17 parâmetros de potencial zeta, índice de polidispersão e tamanho das partículas.
- 18 • Determinar a curva de liberação da Fluopsina C livre e lipossomal através de
19 células de Franz.
- 20 • Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da Fluopsina C lipossomal contra *K.*
21 *pneumoniae* ATCC 10031 e KPN-19.
- 22 • Avaliar a citotoxicidade da Fluopsina C lipossomal *in vitro*, em células LLC-MK2
23 pelo método de redução de MTT.
- 24 • Determinar o modelo de infecção por *K. pneumoniae* KPN-19 em camundongos.
- 25 • Avaliar a melhor dose protetora de Fluopsina C livre e lipossomal contra o
26 modelo de infecção proposto.
- 27 • Determinar a dose letal e toxicidade aguda e crônica da Fluopsina C lipossomal
28 em fígado e rins de camundongos não infectados.

1 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 3.1 COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

3 Há 100 anos, intervenções médicas que consideramos corriqueiras
4 eram altamente preocupantes e até mesmo impossíveis devido à alta taxa de
5 mortalidade. A medicina moderna, como temos hoje, só é possível devido ao
6 descobrimento de uma categoria de moléculas, os antimicrobianos (World Health
7 Organization, 2022). O uso destes compostos mudou para sempre as intervenções
8 médicas, uma vez que pela primeira vez as temidas infecções podiam ser controladas.
9 Com isso, juntamente com a grande Era de Ouro dos antimicrobianos, deu-se início à
10 capacidade de realização de transplantes, cirurgias em geral, tratamento para
11 cânceres, entre diversos procedimentos médicos que mudaram para sempre a saúde
12 humana e a sociedade (Wright *et al.*, 2017).

13 Nos produtos naturais foram encontrados uma grande variedade de
14 moléculas com múltiplas atividades biológicas e usos, principalmente na medicina
15 humana, veterinária e agricultura (Katz e Baltz, 2016). Sendo que tais produtos
16 naturais, derivados de microrganismos e seus análogos, foram até hoje nossa defesa
17 mais bem-sucedida contra as doenças infecciosas, com estruturas moleculares
18 aperfeiçoadas ao longo da história evolutiva de cada microrganismo para exercerem
19 sua atividade biológica competitiva e seletiva (Challinor e Bode, 2015). Estes
20 compostos são produtos de milhões de anos de evolução, sendo criados a partir da
21 pressão seletiva para interagir com alvos celulares com alta eficiência e seletividade,
22 inclusive mecanismos para penetrar nas células bacterianas (Wright *et al.*, 2017).

23 A grande maioria dos antimicrobianos que conhecemos são
24 compostos provindos do metabolismo secundário de microrganismos a fim de matar
25 ou inibir outros microrganismos durante a competição por recursos no ambiente
26 natural (Singh *et al.*, 2017). Tais compostos desempenharam um papel importante no
27 século XX, sendo utilizados como produtos biotecnológicos em diferentes áreas, em
28 especial como antimicrobianos, no tratamento de diversas doenças infecciosas
29 (Afonso *et al.*, 2022). Os microrganismos isolados do solo (sejam bactérias ou fungos)
30 são os principais alvos para a descoberta de novas moléculas (Singh *et al.*, 2017).

31 Entre as bactérias conhecidamente produtoras de antimicrobianos, a

1 ordem Actinomycetales é particularmente digna de nota, sendo que *Streptomyces* sp.
2 são responsáveis pela produção de aproximadamente 80% do total de compostos
3 com atividade antimicrobiana conhecida (Challinor e Bode, 2015; Singh *et al.*, 2017).
4 Cerca de sete mil metabólitos secundários diferentes com atividade antimicrobiana,
5 antifúngica ou moduladores de resposta imune foram descobertos a partir de isolados
6 de *Streptomyces* sp. (Singh *et al.*, 2017).

7 3.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

8 A Resistência Antimicrobiana (RA) é definida como a capacidade dos
9 microrganismos causadores de doenças de resistir aos efeitos terapêuticos dos
10 medicamentos antimicrobianos (Eleraky *et al.*, 2020). O uso de antimicrobianos cria
11 uma pressão seletiva que impulsiona a seleção de cepas resistentes, sendo assim
12 cada novo antimicrobiano tem uma “data de validade interna”, sendo iminente que a
13 resistência se apresente (Challinor e Bode, 2015).

14 Em seu discurso no Nobel em 1945, Fleming alertou sobre o potencial
15 do surgimento de resistência bacteriana para minar a eficácia da penicilina recém-
16 descoberta (Wright *et al.*, 2017). Ele próprio foi o primeiro a evidenciar que isolados
17 de *Escherichia coli* e outras bactérias não eram inibidas pela penicilina (Martin e
18 Bachman, 2018). Realmente, uma década depois, a resistência à penicilina já havia
19 se tornado um grande problema clínico, que não se limitou apenas a penicilina, mas
20 sim um fenômeno observado para cada novo antimicrobiano aprovado (Lessa e
21 Sievert, 2023).

22 Assim, o aumento da RA vem se tornando cada vez mais um desafio
23 de saúde global, com a mortalidade podendo retornar ao nível da era pré-
24 antimicrobiana (Pang *et al.*, 2019). Isso se deve ao fato do uso excessivo de
25 antimicrobianos, má prevenção de infecções e acesso desigual a medicamentos de
26 qualidade, gerando cada vez mais pressão seletiva sobre os microrganismos e,
27 consequentemente, a seleção de mecanismos de resistência (Waters *et al.*, 2023)

28 Os antimicrobianos funcionam por meio de mecanismos singulares,
29 contudo as bactérias, em especial, podem neutralizar estes antimicrobianos de
30 diversas formas, alterando o alvo, modificando ou decompondo a molécula, impedindo
31 a sua entrada ou promovendo a sua saída (Laws, Shaaban e Rahman, 2019; O'Brien;
32 Davoodian; Johnson, 2023). A RA em bactérias pode ser comumente acumulativa,

1 podendo mais de um mecanismo estar presente em uma célula bacteriana, devido a
2 múltiplos genes, com cada um codificando a resistência a um medicamento,
3 normalmente ocorrendo em plasmídeos R de resistência (Catalano *et al.*, 2022). Além
4 disso, a resistência também pode ser vista pelo aumento da expressão de genes que
5 codificam bombas de efluxo, expulsando uma gama de moléculas, assim como na
6 diminuição da permeabilidade de membrana (Laws, Shaaban e Rahman, 2019;
7 Catalano *et al.*, 2022). Finalmente, a RA pode ser ocorrer pela inativação enzimática,
8 pela degradação ou pela transferência de um grupo químico para eles, como por
9 exemplo inativação por hidrólise (identificada para a penicilina e tetraciclina) ou por
10 transferência de grupos acetil, fosforil e adenil (Catalano *et al.*, 2022).

11 Entretanto, a RA pode ocorrer de maneira inata, chamada de
12 resistência intrínseca. Isso ocorre de forma natural, quando qualquer mecanismo
13 citado acima ocorre na ausência de pressão seletiva (Laws, Shaaban e Rahman,
14 2019). Por exemplo, na falta do alvo do antimicrobiano (como visto na resistência à
15 vancomicina em lactobacilos) ou na ausência da via metabólica ou enzima alvo (visto
16 na resistência a metronidazol em bactérias aeróbicas) (Laws, Shaaban e Rahman,
17 2019).

18 Os genes que conferem a RA estão englobados, na maioria das
19 vezes, em elementos móveis como plasmídeos, transposons e integrons, sendo de
20 crucial importância na transmissão vertical desses genes para seus descendentes, e
21 na transmissão horizontal entre cepas compatíveis (Karampatakis, Tsergouli e
22 Behzadi, 2023).

23 Recentemente, dados históricos mostram que a RA matou mais
24 pessoas que qualquer outra doença infecciosa, incluindo a Síndrome da
25 Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (Lessa e Sievert, 2023). Estima-se que uma a cada
26 oito mortes no mundo está ligada a infecções bacterianas, sendo que o *Centers for*
27 *Disease Control and Prevention* (CDC) nos Estados Unidos (EUA) relataram aumento
28 nas infecções Resistentes à Múltiplas Drogas (MDR) durante a pandemia de COVID-
29 19, revertendo o progresso recentemente alcançado no controle da disseminação
30 destas infecções (Lessa e Sievert, 2023; CDC, 2022).

31 No período entre 2013 e 2019 houve uma diminuição das infecções
32 por VRE (*Enterococcus* resistentes à vancomicina) e MRSA (*Staphylococcus aureus*
33 resistente à meticilina) em torno de 41% e 21%, respectivamente, e estabilidade de
34 casos de CRE (Enterobacterales resistentes à Carbapenêmicos) (CDC, 2019).

1 Contudo, há estimativas que preveem que as infecções por MDR se tornem a causa
2 número um de mortes até 2050, podendo levar ao óbito de 10 milhões de pessoas no
3 mundo, e estima-se que 3,8% do produto interno bruto mundial seja perdido devido a
4 RA (Wang *et al.*, 2020; Rocha *et al.*, 2022; WHO, 2022).

5 Cerca de 700.000 pessoas morrem a cada ano em todo o mundo por
6 conta do uso inadequado de antimicrobianos, e consequente emergência de
7 resistência a terapia convencional, levando a perdas estimadas em US\$ 55 a 70
8 bilhões anualmente nos EUA (Eleraky *et al.*, 2020; Rocha *et al.*, 2022). Em 2014, o
9 CDC estimou um custo econômico da RA em cerca de US\$ 20 a 35 bilhões por ano
10 nos EUA (CDC, 2014). Contudo, estima-se que ao não haver o enfrentamento à RA,
11 o custo social e financeiro até 2050 pode chegar a US\$100 trilhões e ainda, Piddock
12 (2016) propõe que, com aproximadamente US\$30 bilhões, poderiam ser
13 implementadas as principais recomendações propostas para que o problema não se
14 agravasse no futuro, embora já estejamos próximos a isso desde a publicação deste
15 levantamento.

16 Em 2008, a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas cunhou o
17 termo ESKAPE para categorizar os microrganismos de maior impacto clínico, que
18 costumavam “escapar” aos tratamentos por conta de diversos perfis de resistência à
19 antimicrobianos, resultando em alta mortalidade (Imran *et al.*, 2022). Entre eles estão
20 *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P.*
21 *aeruginosa* e *Enterobacter* spp., posteriormente foi incluído *E. coli* neste grupo,
22 resultando no “E” adicional de ESKAPEE (Rocha *et al.*, 2022). Até os dias de hoje, o
23 foco de grande parte dos estudos tem como base os microrganismos deste grupo.

24 Kloss e colaboradores (2023) identificaram em seu levantamento as
25 bactérias do grupo ESKAPEE como as mais prevalentes no hospital geral de Curitiba
26 (Paraná), com destaque para *S. aureus* e *K. pneumoniae*, sendo que *A. baumannii* e
27 *K. pneumoniae* apresentaram menor coeficiente de sensibilidade geral a
28 antimicrobianos, com 8,2% e 35,6%, respectivamente. Os índices gerais do Sistema
29 Mundial de Vigilância da Resistência e da Utilização dos Antimicrobianos (*Global*
30 *Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System* - GLASS) de 2021 mostraram
31 que isolados dessas duas espécies apresentam baixo perfil de sensibilidade
32 antimicrobiana no Brasil (WHO, 2021; Kloss *et al.*, 2023). Para *K. pneumoniae* foi
33 identificado porcentagem de RA variando de 19-80% para ceftazidime, ceftriaxone,
34 ciprofloxacino, cotrimoxazole, ertapenem, imipenem e meropenem (WHO, 2021). Já

1 para *A. baumannii*, a porcentagem de resistência de 0-83% foi para amicacina,
2 gentamicina, imipenem, meropenem e tigeciclina (WHO, 2021)

3 O GLASS foi lançado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em
4 2015 a fim de promover a vigilância da RA e informar estratégias para sua contenção,
5 e atualmente 126 países contribuem para o GLASS (WHO, 2022). O GLASS foi o
6 primeiro sistema de comunicação global harmonizada de dados nacionais sobre RA e
7 consumo de antimicrobianos. Além de buscar promover a conscientização nacional,
8 esse plano busca mobilizar financiamento interno e externo para apoio a países de
9 baixa e média renda, onde a luta contra a RA é de máxima urgência, adotando o
10 conceito *One Health* (WHO, 2022).

11 Para enfatizar a necessidade de desenvolvimento de novos
12 antimicrobianos, a OMS publicou em 2017 a lista de patógenos prioritários visando
13 orientar incentivos e financiamentos à pesquisa de novos antimicrobianos, alinhando
14 as prioridades de Pesquisa e Desenvolvimento com as necessidades de saúde
15 pública, apoiando a coordenação global na luta contra a RA (WHO, 2017). Em 2024,
16 houve a atualização desta lista, onde a OMS classifica como prioridade crítica, os
17 microrganismos *A. baumannii* resistente à carbapenem e Enterobacterales (incluindo
18 *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia*
19 spp e *Morganella* spp.) resistentes à carbapenem e cefalosporinas de 3ª geração
20 (WHO, 2024). Numa outra lista, publicada em 2021, com direcionamento para a Índia,
21 as mesmas bactérias e perfis de resistências permanecem como grau de prioridade
22 crítica (Sharma *et al.*, 2021).

23 A RA não se apresenta de forma homogênea em todo o mundo. Seus
24 números são frequentemente regionalizados, com os países mais pobres
25 experimentando níveis mais altos, em especial por conta da indisponibilidade de
26 tratamentos igualitários (Laws, Shaaban e Rahman, 2019). A associação da
27 disseminação de doenças infecciosas e fatores socioeconômicos é bem estabelecida
28 na “medicina social”, onde fatores como renda, condição de moradia, privação e falta
29 de educação são diretamente relacionadas a colonização e/ou infecção por
30 microrganismos MDR (Savoldi *et al.*, 2019). No geral, dados mostram, em um
31 levantamento com 67 países, o aumento da prevalência de RA em infecções invasivas
32 causadas pelos patógenos prioritários classificados pela OMS ao passo que há
33 diminuição da renda nacional, sendo *Klebsiella* spp. a bactéria com maior frequência
34 associada a diminuição da renda por capita (Savoldi *et al.*, 2019)

1 Em 2020, foram relatados aumento de 31 a 82% no uso de
2 antimicrobianos β -lactâmicos em hospitais da América do Sul (Lessa e Sievert, 2023).
3 Dados de prescrição ambulatorial do Brasil (obtidos a partir do banco de dados de
4 prescrição ambulatorial de um pool de 200 mil médicos de 19 estados brasileiros)
5 mostram aumento de até 360% no uso de azitromicina e 90% de ceftriaxona entre
6 adultos (Lessa e Sievert, 2023; Solanky *et al.*, 2023). Juntamente com esse aumento,
7 relatórios do sistema nacional de vigilância à RA mostraram aumento de 65,2%, 77,7%
8 e 61,3% no número total de isolados de espécies de Enterobacterales, *A. baumannii*
9 e *P. aeruginosa*, respectivamente (Lessa e Sievert, 2023).

10 Apesar de toda importância que os antimicrobianos têm na atualidade,
11 campanhas educacionais para o uso prudente dos antimicrobianos, prevenção,
12 vigilância obrigatória, desenvolvimento de testes de diagnóstico rápido e reavaliação
13 dos antimicrobianos antigos já não são o suficiente (CDC, 2014; Challinor e Bode,
14 2015). A realidade da perda de eficácia dos antimicrobianos usados atualmente é
15 cada vez mais próxima e preocupante, ameaçando os tratamentos medicinais como
16 conhecemos e iniciando uma crise global, com desastroso custo humano e econômico
17 (Wright *et al.*, 2017; Laws, Shaaban e Rahman, 2019; Eleraky *et al.*, 2020). Portanto,
18 explorar o mundo microbiano e seu enorme potencial para encontrar novos
19 antimicrobianos para mitigar a RA é uma atitude urgente (Mazzoli, Riedel e Pessione,
20 2017; Catalano *et al.*, 2022).

21 Entretanto, apesar de uma crescente necessidade clínica, a indústria
22 farmacêutica, que liderava a pesquisa e desenvolvimento de antimicrobianos para
23 doenças infecciosas, os abandonou amplamente, dando preferência às doenças
24 crônicas tratáveis e medicamentos com maior retorno de investimento com menor
25 chance de se tornar obsoleto (Wright *et al.*, 2017). Além do processo regulatório longo
26 e difícil, os antimicrobianos são tratamentos de curto prazo, não trazendo receita
27 significativa para as empresas como medicamentos de longo prazo, como os
28 prescritos para colesterol ou pressão alta (Laws, Shaaban e Rahman, 2019).

29 Em 2004, apenas 50 anos após o início do uso dos antimicrobianos,
30 estes representavam menos de 2% dos medicamentos em desenvolvimento clínico.
31 Com o declínio da descoberta de novos compostos para combater a RA, a solução
32 tem sido a modificação de medicamentos existentes (Pinheiro, Magalhães e Reis,
33 2019). Em 2021, a OMS identificou apenas 27 antimicrobianos em desenvolvimento
34 clínico abordando sua lista de patógenos prioritários, e destes apenas 50%

1 confirmaram atividade contra patógenos Gram-negativos de ameaça crítica (Waters
2 *et al.*, 2023).

3 Alguns fatores corroboram com a escassez de novos antimicrobianos
4 em desenvolvimento no mercado. A capacidade dos microrganismos superarem os
5 antimicrobianos disponíveis apresentando resistência antes mesmo da sua utilização
6 comercial é apenas um dos motivos que levam a esse desinteresse (Wang *et al.*, 2020;
7 O'Brien, Davoodian e Johnson, 2023). Também temos que levar em consideração que
8 mesmo que patógenos MDR estejam aumentando em todo o mundo, especialmente
9 em hospitais e outros centros de saúde, os antimicrobianos existentes na maioria das
10 vezes são eficientes especialmente para infecções adquiridas na comunidade. Esses
11 antimicrobianos já consolidados na medicina são baratos e não tóxicos, sendo bom
12 para pacientes, profissionais de saúde e financiadores. Com isso, há dependência
13 complacente desses medicamentos, não escapando da inerente vulnerabilidade à RA
14 e que precisamos de substituições e novas formas de lidar com as infecções (Wright
15 *et al.*, 2017).

16 Outro fator levantado por Wright e colaboradores (2017) é a eficácia
17 e a segurança dos antimicrobianos existentes que fornecem referências exigentes a
18 serem cumpridas. Sendo assim, as razões toxicidade *versus* eficácia são difíceis de
19 serem satisfeitas para novos compostos, dificultando os ensaios clínicos. Isso se
20 sobressai uma vez que, ensaios controlados por placebo não são éticos no domínio
21 dos antimicrobianos, uma vez que a retenção de um medicamento pode levar à morte.
22 Dessa forma, os antimicrobianos são comparados a melhor alternativa disponível
23 resultando na baixa eficácia estatística. Além disso, um antimicrobiano recomendado
24 apenas para tratar infecções graves por MDR, porém que possua certa toxicidade
25 gerenciável, pode não ser aprovado ou indicado na realidade clínica devido à margem
26 de segurança dos antimicrobianos de rotina, pois sem a confirmação rápida de RA
27 opções mais conservadoras de tratamento são priorizadas (Wright *et al.*, 2017).

28 Apesar da maioria dos antimicrobianos atuarem em alvos que só
29 existem em células bacterianas, ainda existe toxicidade, sugerindo que a toxicidade e
30 efeitos colaterais vão além dos diretamente relacionamentos à ligação do alvo
31 farmacológico (Pinheiro, Magalhães e Reis, 2019). Alguns exemplos de toxicidade de
32 antimicrobianos já regulamentados incluem: nefrotoxicidade e ototoxicidade
33 (aminoglicosídeos); distúrbios gastrointestinais e descoloração da dentição
34 (tetraciclinas); anemia, neutropenia, erupção cutânea e lesão da função hepática

1 (rifamicinas); entre outros (Pinheiro, Magalhães e Reis, 2019).

2 3.3 ENTEROBACTÉRIAS E RESISTÊNCIA AOS B-LACTÂMICOS

3 Enterobacterales é uma ordem de bactérias de grande adaptabilidade
4 e patogenicidade, tanto em humanos como animais, estando onipresentes na
5 natureza e fazendo parte da microbiota normal do hospedeiro (Conceição-Neto *et al.*,
6 2022). Mesmo sendo parte da microbiota, cerca de 50% dos pacientes com infecções
7 adquiridas em cuidados de saúde têm como agente causador microrganismos desta
8 ordem, além de representar 80% dos isolados entre bactérias Gram-negativas
9 (Conceição-Neto *et al.*, 2022).

10 Nesta ordem estão agrupadas diversas espécies bacterianas
11 patogênicas humanas. São causadoras de uma variedade de infecções, muitas delas
12 graves, como infecções da corrente sanguínea (ICS), pneumonia adquirida na
13 comunidade, no hospital ou associada à ventilação mecânica, infecções do trato
14 urinário e intra-abdominais (Sheu *et al.*, 2019).

15 A medida em que Enterobacterales resistentes à β -lactâmicos
16 (produtores de β -lactamases) aumentou, também houve um aumento no uso de
17 antimicrobianos carbapenêmicos, e com a intensa pressão seletiva surgiram as cepas
18 produtoras de carbapenemases (Sheu *et al.*, 2019).

19 Os antimicrobianos β -lactâmicos possuem um anel β -lactâmico em
20 sua estrutura química. Neste grupo são classificados os seguintes antimicrobianos:
21 (a) penicilina e seus derivados (penicilinas semissintéticas), (b) cefalosporinas e
22 cefamicinas, (c) monobactâmicos e (d) carbapenêmicos (imipenem, meropenem,
23 ertapenem e doripenem) (Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023). Os
24 carbapenêmicos são antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro usados como
25 tratamento para infecções MDR (Chen e Li, 2023). A ação dos β -lactâmicos se baseia
26 na inibição da biossíntese da parede celular de bactérias, inibindo a transpeptidase e
27 impedindo a síntese de peptideoglicano, o que leva a morte celular por lise (Sheu *et*
28 *al.*, 2019).

29 A crescente disseminação das infecções por Enterobacterales
30 resistentes à carbapenem (CRE) representa uma grande ameaça à saúde humana,
31 sendo urgente que a comunidade médica e científica desenvolvam estratégias novas
32 e eficazes. A primeira delas, foi o aumento de doses de antimicrobianos anti-CRE,

1 como carbapenem, colistina e tigeciclina (Sheu *et al.*, 2019). A segunda estratégia foi
2 combinar esses antimicrobianos, tanto entre si como com inibidores de β -lactamases
3 (Sheu *et al.*, 2019). E por fim, a terceira estratégia, o desenvolvimento de novos
4 antimicrobianos com potencial anti-CRE. Para esse objetivo, os CRE foram incluídos
5 na lista de prioridade crítica para o desenvolvimento de novos antimicrobianos feita
6 pela OMS, mas não apenas devido à resistência aos antimicrobianos (Sheu *et al.*,
7 2019). Isso também se deve à dificuldade no tratamento, longas internações e alta
8 letalidade, que é agravada com o uso ineficiente dos antimicrobianos (Camargo,
9 2022).

10 Desde o início dos anos 2000, a prevalência de CRE aumentou no
11 mundo todo, em especial na América Latina, sendo importante ressaltar que os
12 pacientes uma vez colonizados são reservatórios potenciais, contribuindo para a
13 disseminação silenciosa dessas bactérias resistentes, principalmente no ambiente
14 hospitalar (Camargo, 2022; De Moraes *et al.*, 2022). Infecções por CRE, inclusive,
15 estão se tornando cada vez mais comuns entre crianças em todo o mundo, sendo que
16 nos EUA houve aumento significativo entre 1999 e 2012 entre crianças de 1 a 5 anos
17 (Meng *et al.*, 2023).

18 Diferentes mecanismos podem conferir resistência aos β -lactâmicos,
19 como o efluxo ativo, superexpressão de porinas e alteração nos alvos dos
20 antimicrobianos, contudo, a produção de enzimas carbapenemases é o principal deles
21 (Camargo, 2022). Essas enzimas podem hidrolisar do anel β -lactâmico dos
22 antimicrobianos carbapenêmicos e são frequentemente associadas a elementos
23 genéticos móveis que medeiam a transferência de genes dentre e entre espécies
24 bacterianas (Arcari e Carattoli, 2023).

25 As β -lactamases são enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico,
26 inibindo assim a ação desses antimicrobianos (Martin e Bachman, 2018). Essas
27 enzimas são classificadas funcionalmente pela terminologia proposta por Bush, onde
28 são separadas em três grandes grupos de acordo com seus perfis de substrato e
29 inibidor (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995; Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023).
30 Contudo, a classificação molecular proposta por Ambler é a mais utilizada, tendo como
31 base a sequência de aminoácidos para determinar a filogenia (Ambler, 1980). Dessa
32 forma, são separadas quatro classes: A, B, C e D. Na classe A estão as baseadas em
33 serina, como por exemplo sulfidril variável, com capacidade de hidrolisar cefotaxima,
34 uma β -lactamase de Espectro Estendido (ESBL), carbapenemases de *K. pneumoniae*

1 (KPC), sendo que, em geral, são inibidas tanto *in vivo* como *in vitro* por inibidores de
2 β -lactamase (clavulanato, tazobactam, sulbactam, avibactam, relebactam) (Camargo,
3 2022; Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023).

4 De modo geral, KPC é a mais prevalente de todas as
5 carbapenemases em escala global, tendo sido isolada pela primeira vez em 1996 nos
6 EUA e expandindo-se rapidamente desde então, até se tornar hoje endêmica em
7 diversos países, como EUA, Brasil, Itália, Argentina, entre outros (Conceição-Neto *et*
8 *al.*, 2022; Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023; Borghi, Pereira e Schuenck,
9 2023). No Brasil, o primeiro relato de *K. pneumoniae* produtora de KPC ocorreu em
10 2006, contudo, em análise retrospectiva foram identificados isolados de 2005
11 portadores do gene *bla_{KPC-2}* (Miranda *et al.*, 2019). Localmente, no Paraná o primeiro
12 isolado produtor de KPC ocorreu em 2009, e em 2014 já havia mais de 20 hospitais
13 no estado com casos de infecções por espécies produtoras de KPC (Da Silva e
14 Velasquez, 2018). No estado de São Paulo, juntamente com a disseminação de KPC
15 e o aumento da administração de polimixinas, houve o aumento da resistência às
16 polimixinas, que era de 0% em 2011, 4,8% em 2014 e em 2015 chegou a 27,1%
17 (Conceição-Neto *et al.*, 2022).

18 Na classe B, incluem as carbapenemases que são metalo- β -
19 lactamases (MBL), dispersas em diferentes gêneros de Enterobacterales no Brasil,
20 como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Escherichia* e *Providencia*
21 (Camargo, 2022). Tais enzimas utilizam como co-fator para sua atividade catalítica os
22 íons divalentes, comumente o zinco, para hidrolisar todos os β -lactâmicos, exceto
23 aztreonam, que pertence aos monobactâmicos (Camargo, 2022; Karampatakis,
24 Tsergouli e Behzadi, 2023).

25 Uma das MBLs de maior importância e crescimento na atualidade foi
26 identificada inicialmente na Índia, portanto foi denominada como MBL de Nova Deli
27 (NDM), sendo identificada posteriormente em várias espécies de Enterobacterales
28 (Camargo, 2022). No Brasil, foi identificado pela primeira vez em 2013, isolado de
29 *Providencia rettgeri* no Rio Grande do Sul (Carvalho-Assef *et al.*, 2013). Em um estudo
30 publicado por Wink e colaboradores (2021), em 2015 a frequência de CRE produtora
31 de NDM era de 4%, já em 2020 havia aumentado para 24%. Dessa amostragem, 80%
32 dos isolados foram identificados como *K. pneumoniae*, e foi identificado que 11%
33 também continham a enzima KPC, havendo uma combinação de mecanismos de
34 resistência antimicrobiana (Camargo, 2022).

1 A classe C é constituída por enzimas à base de serina, chamadas
2 cefalosporinases ou β -lactamases AmpC, são estáveis e podem estar localizadas no
3 cromossomo ou em plasmídeos, porém não são inibidas por inibidores de β -
4 lactamase, sendo sensíveis aos carbapenêmicos (Karampatakis, Tsergouli e Behzadi,
5 2023). Por fim, a classe D incluem as oxacilinases (OXA), altamente heterogêneas
6 quanto a estrutura e características bioquímicas, portanto, possuem grande variedade
7 quanto ao potencial hidrolítico e são consideradas altamente virulentas
8 (Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023). Dentre elas, a carbapenemase OXA-48,
9 inicialmente detectada na Turquia em 2001, se destaca frente as demais (Sheu *et al.*,
10 2019).

11 Com a presença cada vez mais comum da resistência aos
12 antimicrobianos β -lactâmicos, nos últimos anos, as polimixinas (colistina e polimixina
13 B) e tigeciclinas tornaram-se o tratamento alternativo para infecções por CRE (Sheu
14 *et al.*, 2019; Rocha *et al.*, 2022). Porém, essa pressão seletiva levou ao aumento da
15 resistência a estes antimicrobianos em diversas regiões do mundo. A resistência às
16 polimixinas ocorre por dois mecanismos principais, pela alteração intrínseca mediada
17 por cromossomo e/ou mediado por plasmídeo, ambos se relacionando às
18 modificações nos lipopolissacarídeos (LPS) (Rocha *et al.*, 2022).

19 3.3.1 *Klebsiella pneumoniae*

20 O complexo de espécies *K. pneumoniae* inclui *K. pneumoniae*, *K.*
21 *quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp.
22 *similipneumoniae*, *K. varicola* subsp. *varicola* e *K. varicola* subsp. *tropica* (Morgado,
23 Fonseca, Vicente, 2022).

24 Contudo, *K. pneumoniae* (para este trabalho, refere-se a espécie
25 ‘*sensu stricto*’) se destaca entre as demais espécies da ordem Enterobacterales
26 (Arcari e Carattoli, 2023), sendo a espécie mais estudada, principalmente devido à
27 frequente associação a surtos de infecções hospitalares e a resistência antimicrobiana
28 (Morgado, Fonseca, Vicente, 2022).

29 *K. pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa fermentativa, imóvel,
30 encapsulada e onipresente, estando presente inclusive na microbiota intestinal de
31 humanos e animais saudáveis (Joseph *et al.*, 2021; Arcari e Carattoli, 2023). Foi
32 descrita pela primeira vez em 1882, isolada dos pulmões de pacientes que morreram

1 de pneumonia, apresentando fenótipo mucóide conferido pela cápsula de
2 polissacarídeo, e fermentação de lactose (Martin e Bachman, 2018).

3 É considerado um patógeno oportunista, capaz de colonizar o epitélio
4 mucoso do intestino, nasofaringe e pele. Entretanto, pode atingir tecidos profundos e
5 corrente sanguínea de pacientes suscetíveis, causando infecções graves como
6 pneumonia, meningite, endoftalmite, abscessos hepáticos, infecções no trato urinário e
7 bacteremia, podendo levar a sepse (Joseph *et al.*, 2021; De Moraes *et al.*, 2022).

8 Embora possa colonizar o intestino naturalmente, em cerca 6 a 19%
9 da população, 50% das infecções por *K. pneumoniae* resultam da microbiota dos
10 próprios pacientes sendo responsável por cerca de um terço de todas as infecções
11 por Gram-negativas (Joseph *et al.*, 2021; Uzairue *et al.*, 2022). O que surpreende, é
12 que a taxa de mortalidade para infecções por *K. pneumoniae* é alta, variando de 21 a
13 50% com base no perfil de sensibilidade de antimicrobianos (Arcari e Carattoli, 2023;
14 Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023). Contudo, a progressão do comensalismo
15 para doença depende não só da imunocompetência do hospedeiro, pois nem todas
16 as cepas colonizadoras são capazes de causar doenças, mas também dos genes que
17 a bactéria possui (Martin e Bachman, 2018).

18 A colonização do intestino pode ser considerada um dos fatores de
19 risco associados à infecção por *K. pneumoniae*. Geralmente inclui-se também, o
20 tratamento prévio com antimicrobianos, hospitalização prolongada, permanência em
21 Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), ventilação mecânica, dentre outros
22 procedimentos invasivos (Martin e Bachman, 2018; Miranda *et al.*, 2019; De Campos
23 *et al.*, 2022).

24 Além de causar infecções, a capacidade de formar biofilme em
25 dispositivos médicos (como cateter) é preocupante, uma vez que leva a infecções
26 subsequentes, em especial os tratos urinário e respiratório (Martin e Bachman, 2018;
27 Joseph *et al.*, 2021).

28 Estima-se que *K. pneumoniae* tem um genoma *core* de cerca de 2.000
29 genes, contudo, mesmo com a variação do genoma acessório, têm tipicamente entre
30 5.000 e 6.000 genes em seu genoma total, significando que a maioria do genoma é
31 composta de genes acessórios (Martin e Bachman, 2018). A correlação entre sua
32 onipresença ecológica e sua capacidade de transportar genes de RA, a torna uma
33 notável candidata para a transferência horizontal entre bactérias Gram-negativas em
34 diversos nichos, expandindo a variabilidade de isolados portadores de genes de RA

1 fora do ambiente hospitalar (Joseph *et al.*, 2021).

2 *K. pneumoniae* têm sua importância epidemiológica devido duas
3 diferentes vias evolutivas, podendo ser considerados dois patótipos: *K. pneumoniae*
4 hipervirulenta (hvKp) e *K. pneumoniae* multirresistente (MDR-Kp), resultando em
5 diferentes interações hospedeiro-microrganismo (Arcari e Carattoli, 2023). Contudo,
6 já foram identificados isolados convergentes de ambos patótipos, que continham *locus*
7 de síntese de aerobactina e produtoras de enzimas ESBL ou carbapenemases
8 (Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023).

9 Uma pequena proporção de isolados MDR-Kp surgiram por mutações
10 cromossômicas (como para colistina ou tigeciclina), além da conhecida resistência
11 intrínseca à ampicilina, devido à genes cromossômicos que codificam β -lactamase
12 (*SHV-1*) (Joseph *et al.*, 2021; Arcari e Carattoli, 2023). A maioria dos isolados MDR-
13 Kp é resultante da transferência horizontal de genes e plasmídeos conjugativos
14 (Morgado, Fonseca, Vicente, 2022; Arcari e Carattoli, 2023). Desses genes que
15 conferem a resistência, podemos citar os que codificam para produção de β -
16 lactamases de Espectro Estendido (ESBL), AmpC e carbapenemases mediadas por
17 plasmídeos (Morgado, Fonseca, Vicente, 2022).

18 Os isolados MDR-Kp podem apresentar RA devido a outros
19 mecanismos além da produção de enzimas, como pela diminuição da permeabilidade
20 celular, superexpressão de bombas de efluxo e modificação do alvo do agente
21 antimicrobiano (Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023). Contudo, a produção de
22 enzimas, em especial a disseminação das carbapenemases foi decisiva para a
23 expansão de MDR-Kp globalmente.

24 A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos foi identificada em
25 1983 pela primeira vez em *K. pneumoniae*, sendo devido a produção de ESBL (De
26 Moraes *et al.*, 2022). Em 1996, foi isolado pela primeira vez uma cepa de *K.*
27 *pneumoniae* produtora da enzima KPC, nos EUA (Munoz-Price *et al.*, 2013). Em 2009,
28 devido a sua disseminação mundial, ela foi incluída no grupo ESKAPEE, assim como
29 de prioridade crítica no levantamento da OMS (WHO, 2017; Rocha *et al.*, 2022).
30 Atualmente, *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos é um dos patógenos de
31 maior risco de vida no mundo (Borghini, Pereira e Schuenck, 2023). Desde 1996, a
32 enzima KPC se tornou a carbapenemase mais prevalente em *K. pneumoniae*, onde
33 mais de 100 genes de RA já foram identificados, sendo principalmente transportados
34 por plasmídeos (Arcari e Carattoli, 2023).

1 As infecções causadas por MDR-Kp trazem consigo um grande
2 desafio aos cuidados médicos, principalmente devido à sua rápida disseminação,
3 especialmente em ambientes de UTI, além da capacidade de adquirir múltiplos genes
4 de RA e da escassez de opções de tratamentos eficazes (Arcari e Carattoli, 2023).

5 Em um estudo realizado por Morgado, Fonseca e Vicente (2022),
6 foram analisados 399 genomas de *Klebsiella* spp. no Brasil, isolados do meio
7 ambiente, animais e humanos de todas as regiões do país entre 2003 e 2020. O ser
8 humano foi a fonte de isolados com maior proporção de MDR, 92%, em comparação
9 com meio ambiente (66%) e animal (46%). 336 isolados foram positivos para β -
10 lactamases, onde 17,5% apresentaram apenas ESBLs, 49,1% apresentaram
11 carbapenemases e 33,4% produziam carbapenemases com determinantes de
12 resistência à colistina. Embora os isolados produtores de ESBL estejam isoladamente
13 em menor frequência, a resistência combinada com genes de carbapenemases e
14 colistina foi notada. Assim, 77% dos isolados produtores de carbapenemases também
15 produziam ESBL, e 75% dos genomas com determinantes de resistência à colistina
16 também continham para ESBL. Dessa forma, a presença de ESBL foi identificada em
17 80,9% dos isolados positivos para β -lactamases, sendo que a maioria deles estava
18 associada a genes de carbapenemases (Morgado, Fonseca e Vicente, 2022).

19 Em 2012, cerca de 42,2% das amostras analisadas por Da Silva e
20 Velasquez (2018) eram produtoras de ESBL. No ano seguinte, 55,5% eram ESBL, e
21 em 2014, 78% apresentavam perfil de resistência aos antimicrobianos (Da Silva e
22 Velasquez, 2018).

23 Em outro estudo brasileiro, Conceição-Neto e colaboradores (2022)
24 reportaram que todos os 502 isolados de *K. pneumoniae* eram MDR, sendo o gene
25 *bla_{KPC}* o mais frequente (77% dos isolados). Além disso, apresentaram a frequência
26 de 29,5% de resistência a colistina, 64,9% a tetraciclina, 68,2% a gentamicina e 19,6%
27 foram resistentes a todos os antimicrobianos testados. Dentre os isolados resistentes
28 a colistina, 80,3% eram produtores de carbapenemases, sendo 77% do tipo KPC,
29 indicando que a pressão seletiva criada com o aumento do uso de colistina como
30 medicamento de primeira linha aumentou a frequência de isolados resistentes
31 (Conceição-Neto *et al.*, 2022). Assim, os autores sugerem que, para isolados com
32 esse perfil de RA recomenda-se opções alternativas com maior taxa de
33 susceptibilidade, como a amicacina (65,6%), gentamicina (31,8%), e aminoglicosídeos
34 (22,3%).

1 Na China, mais de 40% dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* eram
2 MDR-Kp, sendo a produção de KPC o mecanismo de resistência mais comum e, em
3 semelhança com o Brasil, o *bla*_{KPC-2} foi o genótipo mais observado (Qin *et al.*, 2020).
4 Em um estudo retrospectivo realizados com pacientes pediátricos na China, Meng e
5 colaboradores (2023) reportaram que todos os isolados MDR-Kp foram resistentes ao
6 imipenem e aztreoman, e as corresponsências mais comuns foram a gentamicina
7 (78,6%), amicacina (72,7%) e ciprofloxacina (87%). Em compensação, a tigeciclina
8 (0%) e colistina (3%) foram os que tiveram menos isolados com genes de resistência.

9 No Brasil, o primeiro isolado MDR-Kp com resistência a
10 carbapenêmicos e colistina ocorreu em 2016, de um paciente internado na UTI. Pela
11 análise feita por Rocha e colaboradores (2022), em um hospital terciário de Salvador
12 com pacientes posteriores a esta data, foi identificado que comorbidades relevantes
13 para este perfil de infecção seriam a hipertensão (38,7%), diabetes (32,2%) e doença
14 cardiovascular (25,8%). Como esperado, o mesmo estudo identificou que a maioria
15 dos pacientes foi submetida a ventilação mecânica (90,3%), cateter venoso central
16 (93,5%) e cirurgia (38,7%), levando a infecção do sítio cirúrgico, pneumonia, infecção
17 de corrente sanguínea (ICS) e infecção do trato urinário. A letalidade da infecção foi
18 de 58,4%, estando condizente com a literatura inclusive em outros países, variando
19 de 40,6 a 64% (Rocha *et al.*, 2022). Em um outro estudo brasileiro, 100% dos casos
20 de *K. pneumoniae* foram resistentes a múltiplos medicamentos (Frediani *et al.*, 2023).

21 Um fator notável apontado por Rocha e colaboradores (2022) em seu
22 levantamento, é que, anteriormente ao estudo, entre 2015 e 2016, mais de 70% do
23 isolados de Enterobacterales eram CRE. Como resultado, foi recomendado a terapia
24 combinada de polimixina e carbapenem como tratamento empírico para sepse.

25 Alguns fatores acerca da escolha do antimicrobianos também
26 contribuem para a alta mortalidade nesses casos de infecções. Como a acessibilidade
27 dos antimicrobianos necessários aos tratamentos, que é diretamente associada aos
28 custos da administração, onde muitas vezes não é possível de ser arcada pelo
29 paciente nem pela instituição hospitalar (Meng *et al.*, 2023). Além disso, os padrões
30 de uso refletem a propensão dos médicos a preferirem antimicrobianos familiares em
31 vez de alternativos novos, uma prova disso é que as UTIs brasileiras utilizam mais
32 antimicrobianos de reserva, cerca de 40%, frente 16% na Suécia (Meng *et al.*, 2023;
33 Silva *et al.*, 2023). Para Silva e colaboradores (2023), “antimicrobianos de reserva”
34 formam um grupo de antimicrobianos que devem ser considerados de última opção

1 terapêutica, e devem ser o foco dos programas de monitoramento de antimicrobianos,
2 como a daptomicina, linezolid, polimixina B, colistina e tigeciclina.

3 Dentre as opções de tratamento para MDR-Kp, temos a colistina, um
4 antimicrobiano descoberto em 1949 pertencente às polimixinas. Seu uso como
5 tratamento antibacteriano sistêmico havia sido abandonado no início da década de
6 1980 devido à alta nefrotoxicidade, no entanto, com a propagação da RA, a colistina
7 voltou a ser utilizada (Uzairue *et al.*, 2022; Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023).
8 Atualmente, constitui tratamento amplamente utilizado na prática para infecções
9 causadas por MDR-Kp, sendo considerada um antimicrobiano de último recurso (De
10 Moraes *et al.*, 2022).

11 Apesar disso, a monoterapia a base de colistina tem sido associada
12 com desfechos negativos na prática clínica, principalmente por conta da disseminação
13 da RA, se mostrando um novo desafio terapêutico (De Moraes *et al.*, 2022;
14 Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023). Para resultados satisfatórios, a colistina é
15 geralmente administrada em protocolos terapêuticos combinados juntamente com
16 tigeciclina ou aminoglicosídeos, ou ainda em combinações triplas, com tigeciclina e
17 carbapenêmicos, fosfomicina ou aminoglicosídeos (Karampatakis, Tsergouli e
18 Behzadi, 2023). Mesmo com isso, existe uma possível evolução da resistência à
19 colistina num cenário com MDR-Kp, que pode chegar a 43% de resistência em
20 isolados CRE, a variar pelo país (Uzairue *et al.*, 2022).

21 A tigeciclina é uma outra opção utilizada no tratamento contra
22 infecções MDR-Kp, principalmente pneumonia, inclusive sendo utilizada em
23 combinação com a colistina, possui amplo espectro de ação, atingindo altas
24 concentrações em fluídos biológicos, como pulmão, pele, tecidos moles e ossos
25 (Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023). A fosfomicina é outro antimicrobiano
26 antigo que voltou a ser utilizado no tratamento de infecções por MDR-Kp em UTIs,
27 principalmente em combinação com a colistina (Chong, Shimoda e Shimono, 2018;
28 Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023).

29 Nos últimos cinco anos, alguns antimicrobianos foram aprovados pela
30 *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA e pela Agência Médica Europeia (EMA),
31 sendo eles: plazomicina, eravaciclina, cefiderocol e temocilina (Lan *et al.*, 2022;
32 Karampatakis, Tsergouli e Behzadi, 2023). Juntamente, alguns antimicrobianos β -
33 lactâmicos com inibidores de β -lactamase foram consideradas alternativas
34 conhecidas, como ceftolozano-tazobactam, meropenem-vaborbactam, imipenem-

1 cilastatina/relebactam e ceftazidima-avibactam (Karampatakis, Tsergouli e Behzadi,
2 2023). Infelizmente, esses inibidores não são ativos para todas as carbapenemases,
3 por exemplo, o avibactam inibe tanto a enzimas da classe A (KPC) como classe D
4 (OXA), porém vaborbactam e relebactam inibem apenas a classe A (Sheu *et al.*,
5 2019).

6

7 3.3.1.1. Infecção de corrente sanguínea (ICS) e sepse.

8

9 A sepse é caracterizada como uma reação do hospedeiro à infecção,
10 envolvendo tanto a ativação de respostas pró como anti-inflamatórias, além de
11 modificações em vias não imunológicas (cardiovasculares, autonômicas,
12 neurológicas, hormonais, metabólicas e de coagulação) (Rello *et al.*, 2017). Com isso,
13 em 2016, a conferência Sepsis-3 definiu sepse como uma "disfunção orgânica com
14 risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção" e
15 choque séptico como um "subconjunto de sepse no qual as anormalidades
16 circulatórias e celulares/metabólicas subjacentes são severas o suficiente para
17 aumentar substancialmente a mortalidade" (Singer *et al.*, 2016).

18 As ICSs estão entre as mais graves, sendo uma das causas mais
19 comuns de morte em pacientes hospitalizados em UTI (Rello *et al.*, 2017; Frediani *et*
20 *al.*, 2023). A mortalidade por sepse diminuiu na última década, contudo ainda
21 permanece, frequentemente, acima dos 20% mesmo com os cuidados ideais (Remick
22 *et al.*, 2019; Kochan *et al.*, 2022). Em adultos, a ICS é a sétima principal causa de
23 morte nos EUA e Europa, e a identificação do microrganismo responsável é crucial
24 para o diagnóstico (Frediani *et al.*, 2023). Dentre as bactérias causadoras de ICS, as
25 Gram-negativas, em especial *E. coli* e *K. pneumoniae*, são as mais frequentes
26 (Lipworth *et al.*, 2021).

27 O lipopolissacarídeo (LPS), componente da membrana externa de
28 bactérias Gram-negativas, é conhecido como endotoxina, principalmente pela reação
29 do sistema imunológico do hospedeiro (Martin e Bachman, 2018). O receptor Toll-like
30 4 do hospedeiro ao detectar o LPS ativa uma cascata inflamatória, sendo isso, a levar
31 a patogênese da sepse e ao choque séptico (Martin e Bachman, 2018).

32 A ICS pode ser considerada uma infecção primária, sem fonte
33 identificável, ou secundária, onde existe uma fonte conhecida. Fontes comuns de ICS
34 incluem o trato urinário, trato gastrointestinal, cateteres intravenosos ou urinários,

1 além do trato respiratório (Martin e Bachman, 2018). Lipworth e colaboradores (2021),
2 em seu estudo epidemiológico (2008-2018) genômico regional no Reino Unido
3 identificaram que fontes urinárias foram as mais predominantes para isolados de *K.*
4 *pneumoniae* e *E. coli* causadores de ICS.

5 Distinguir a origem da infecção é uma prioridade, uma vez que
6 favorece o tratamento precoce com antimicrobianos a fim de controlar a fonte da
7 contaminação (Rello *et al.*, 2017). Devido ao atraso no diagnóstico do quadro de sepse
8 e, em consequência disso, da administração do antimicrobiano correto, a sobrevida
9 do paciente pode diminuir em 7,6% a cada hora de atraso, aumentando o risco de
10 agravamento, levando ao choque séptico (Rello *et al.*, 2017).

11 É pertinente também enfatizar que *K. pneumoniae* pode causar ICS
12 em duas categorias: (i) infecções multirresistentes associadas aos cuidados da saúde
13 e (ii) infecções associadas à comunidade (Lipworth *et al.*, 2021). Embora essas
14 categorias possam ser úteis, a ideia de que isolados MDR-Kp causadores de ICS são
15 frequentes apenas no ambiente hospitalar não se sustenta. No estudo de Lipworth e
16 colaboradores (2021), foi reportado que cerca de um terço dos isolados MDR-Kp eram
17 provindos de infecções associadas à comunidade, levantando a questão de quão
18 oportunistas essas cepas são, sugerindo a existência de diferentes reservatórios,
19 pressões seletivas e modos de aquisição na comunidade.

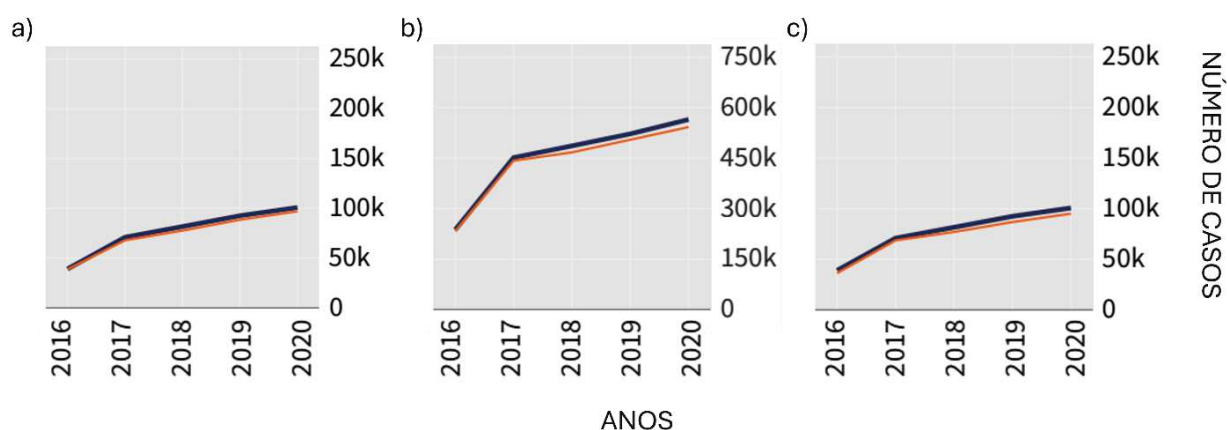
20 Os β -lactâmicos são a classe de antimicrobianos de uso empírico
21 mais prescritos para *K. pneumoniae*, pela sua eficácia, baixo custo e toxicidade, como
22 exemplo estão as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos
23 (Frediani *et al.*, 2023). Com o aumento de isolados produtores de ESBL, os
24 carbapenêmicos foram os mais utilizados para infecções graves. Contudo, com a
25 disseminação das MDR-Kp produtora de KPC, o tratamento ficou mais restrito, com o
26 uso de polimixinas, tigeciclinas e aminoglicosídeos (Frediani *et al.*, 2023).

27 O GLASS (WHO, 2022) indicou níveis muito elevados de RA em
28 patógenos causadores de ICS, e, embora seja recomendado o tratamento empírico
29 com cefalosporinas de terceira geração, têm sido notificados casos crescentes de *K.*
30 *pneumoniae* com esse perfil de resistência. *K. pneumoniae* é o terceiro maior
31 causador de ICS, podendo conduzir ao aumento da utilização de carbapenêmicos de
32 último recurso (Figura 1) (WHO, 2022).

33 No estudo de De Campos e colaboradores (2022), foi identificado que
34 *K. pneumoniae* produtora de KPC foi o microrganismo Gram-negativo mais frequente.

1 Os autores também observaram que a maioria das cepas de MDR-Kp pertenciam ao
 2 mesmo clone epidêmico, inferindo que existia a transmissão cruzada destes
 3 elementos genéticos que conferiam resistência. A mortalidade encontrada na coorte
 4 deste grupo de pesquisa foi de 41%, sendo que a mortalidade por ICS MDR foi ainda
 5 maior, de 77,3%. A Rede Brasileira de Pesquisa em Terapia Intensiva, no mesmo ano,
 6 relatou 34,8% de mortalidade total em seu levantamento e 55,7% entre pacientes com
 7 sepse (De Campos *et al.*, 2022).

8
 9 **Figura 1** – Número de casos reportados de infecções na corrente sanguínea (em azul)
 10 e infecções com reporte de resistência antimicrobiana (em amarelo) ao longo dos anos
 11 (2016-2020) para países participantes do GLASS. (a) Total de casos reportados; (b)
 12 casos reportados de *K. pneumoniae* resistente à carbapenêmicos; (c) casos
 13 reportados de *K. pneumoniae* resistente à cefalosporinas de terceira geração.



14
 15 **Fonte:** adaptado de WHO, 2022.

16
 17 Silva e colaboradores (2023) investigaram a variação geográfica
 18 brasileira de patógenos e tratamentos administrados em casos de ICS associada ao
 19 cateter venoso central. Foi observado que o principal patógeno responsável foi *K.*
 20 *pneumoniae* resistente à cefalosporina de 3^a/4^a geração, seguido por *K. pneumoniae*
 21 resistente à carbapenêmicos. Além disso, de 2018 a 2020, o meropenem foi o
 22 antimicrobiano mais utilizado nas UTIs brasileiras, seguido da ceftriaxona, podendo
 23 ser explicado pela alta incidência de infecções por patógenos resistentes às
 24 cefalosporinas. A linezolida intravenosa foi o que mais teve tendência de aumento de
 25 uso (36,1%) e o que mais diminuiu foi o uso da fluoroquinolona. Em especial, o Sul do
 26 país foi a região com aumento mais significativo no uso de linezolida e polimixina B, o

1 que não acompanha as tendências mundiais de combate ao MDR, principalmente com
2 o aumento de isolados *K. pneumoniae* resistentes à poliximina (Silva *et al.*, 2023).

3 No estudo brasileiro realizado por De Moraes e colaboradores (2022),
4 foram analisados 107 pacientes com ICS por *K. pneumoniae*. Foi encontrado que
5 23,4% dos isolados eram produtores de ESBL e 50,5% eram resistentes à
6 carbapenêmicos, sendo que destes últimos, 48% tinham resistência adicional às
7 polimixinas.

8 Em um estudo retrospectivo realizado com pacientes pediátricos na
9 China realizado por Meng e colaboradores (2023), que examinou a epidemiologia da
10 infecção MDR-Kp, mais de 31% dos isolados *K. pneumoniae* eram MDR-Kp e 30%
11 dos pacientes acabaram por desenvolver choque séptico. O mesmo estudo reportou
12 uma mortalidade em 30 dias de 39,4% em neonatos com ICS, enquanto a mortalidade
13 em 30 dias entre crianças não-neonatas foi de 43,2%, destacando o aumento frente
14 ao levantamento anterior, que havia identificado 11,5% e 18,5% de mortalidade,
15 respectivamente. Os autores também destacam que a antibioticoterapia inadequada
16 estava associada ao aumento da mortalidade entre todos os pacientes, independente
17 da gravidade da doença ou perfil de resistência do microrganismo.

18 Em outro estudo retrospectivo realizado por Chen e colaboradores
19 (2022) no mesmo país, com 252 pacientes idosos com ICS nos anos de 2011 a 2020,
20 11,5% dos isolados de *K. pneumoniae* foram considerados resistentes à
21 carbapenêmicos. Quanto ao desfecho clínico, para os pacientes com MDR-Kp houve
22 taxa de mortalidade de 48,3% enquanto, para *K. pneumoniae* sensível à
23 antimicrobianos foi de 5,83%. Os autores também destacam que, para pacientes
24 idosos, a hipertensão, exposição à carbapenêmicos e permanência na UTI estiveram
25 associados ao desenvolvimento de ICS por MDR-Kp.

26 Além dos carbapenêmicos, a recente resistência de isolados de ICS
27 à colistina têm trazido preocupações, uma vez que há poucos antimicrobianos para
28 tratamento nesses casos, aumentando ainda mais a mortalidade. No estudo de
29 Uzairue e colaboradores (2022), 80,1% dos isolados de *K. pneumoniae* causadores
30 de ICS foram MDR-Kp, sendo que os perfis de resistência mais comuns foram: 45,3%
31 à ciprofloxacina, 44,4% ao ertapenem e 33,3% à gentamicina. Os mesmos autores
32 advertem também, que embora pequena (3,1%), a resistência à colistina nesses
33 isolados merece atenção, uma vez que o uso da colistina quadruplicou de 2006 a 2012
34 e pode ter aumentado ainda mais durante a pandemia de COVID-19.

1 Em suma, na literatura a taxa de mortalidade de ICS por MDR-Kp é
2 variável, podendo ser de 15 a 79% (De Moraes *et al.*, 2022). A falha terapêutica
3 aparece com frequência como agravante para a alta taxa de mortalidade, tendo mais
4 destaque conforme a amplitude do perfil de resistência do isolado de ICS. A utilização
5 de polimixinas e carbapenêmicos de modo inadequado pelos médicos têm trazido o
6 aumento de casos de ICS por *K. pneumoniae* com esse perfil de resistência,
7 aumentando assim a taxa de mortalidade, estando ambas diretamente relacionadas
8 (De Moraes *et al.*, 2022).

9 3.4 FLUOPSINA C

10 Isolada pela primeira vez por Egawa e colaboradores em 1970, a
11 Fluopsina C ([bis(N-metiltioformohidroxamato)Cu(II)] ou $C_4H_8N_2O_2S_2Cu$) é um
12 composto de baixo peso molecular (~243,786g g/mol), termoestável (ponto de
13 decomposição: 182°C), produzido pelo metabolismo secundário não só por cepas de
14 *Pseudomonas* spp., mas também por *Streptomyces* sp., quando cultivados na
15 presença de cobre (Shirahata *et al.*, 1970; Itoh, Inuzuka e Suzuki, 1970; Miyamura *et*
16 *al.*, 1972; Del Rio *et al.*, 1972; Martinez-Molina, Del Rio e Olivares, 1976; Ko *et al.*,
17 1993; Hedman *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2013).

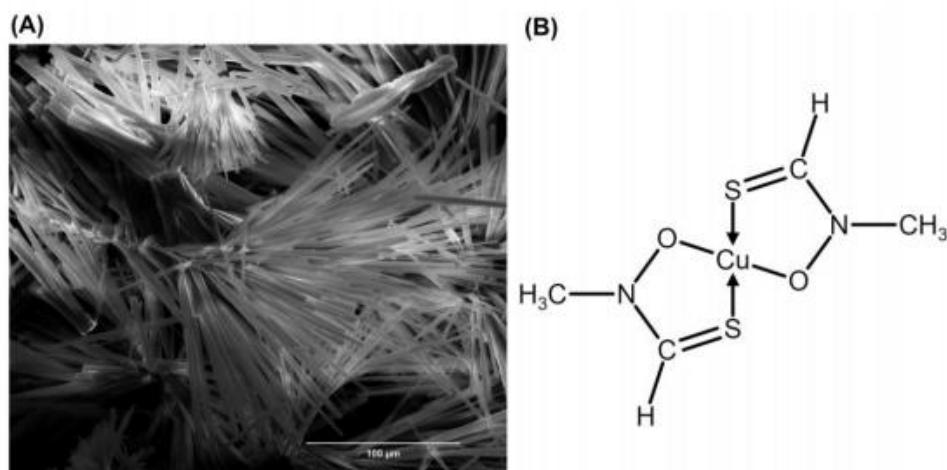
18 A Fluopsina C, quando purificada, se apresenta na forma de cristais
19 finos, prismáticos e de cor verde-escura ou acastanhada (Figura 2A) (Egawa *et al.*,
20 1970; Shirahata *et al.*, 1970; Afonso *et al.*, 2022). O composto é considerado um
21 quelato de cobre, sendo formado durante uma reação de complexação entre íons
22 cúpricos e duas moléculas do sideróforo tioformina (Ácido *N*-
23 metiltioformohidroxâmico) (Figura 2B), onde o cobre é necessário para sua atividade
24 antimicrobiana (Del Rio *et al.*, 1972; Leong e Bell., 1978; Kakkar, Dua e Gahlot., 2007).

25 Em culturas de *Pseudomonas* spp., foi identificado e denominado
26 primeiramente de antimicrobiano YC 73 (Egawa *et al.*, 1970). Posteriormente, foi
27 detectado por outros grupos de pesquisa, e denominado também de antimicrobiano
28 B1 e composto antibiótico organocúprico (OAC), até ser molecularmente identificada
29 como Fluopsina C (Afonso *et al.*, 2022).

30
31
32

1

2 **Figura 2** – Fluopsina C. (A) Microscopia eletrônica de cristais de Fluopsina C; (B)
3 estrutura molecular da Fluopsina C.



4

5

Fonte: Afonso *et al.*, 2022.

6

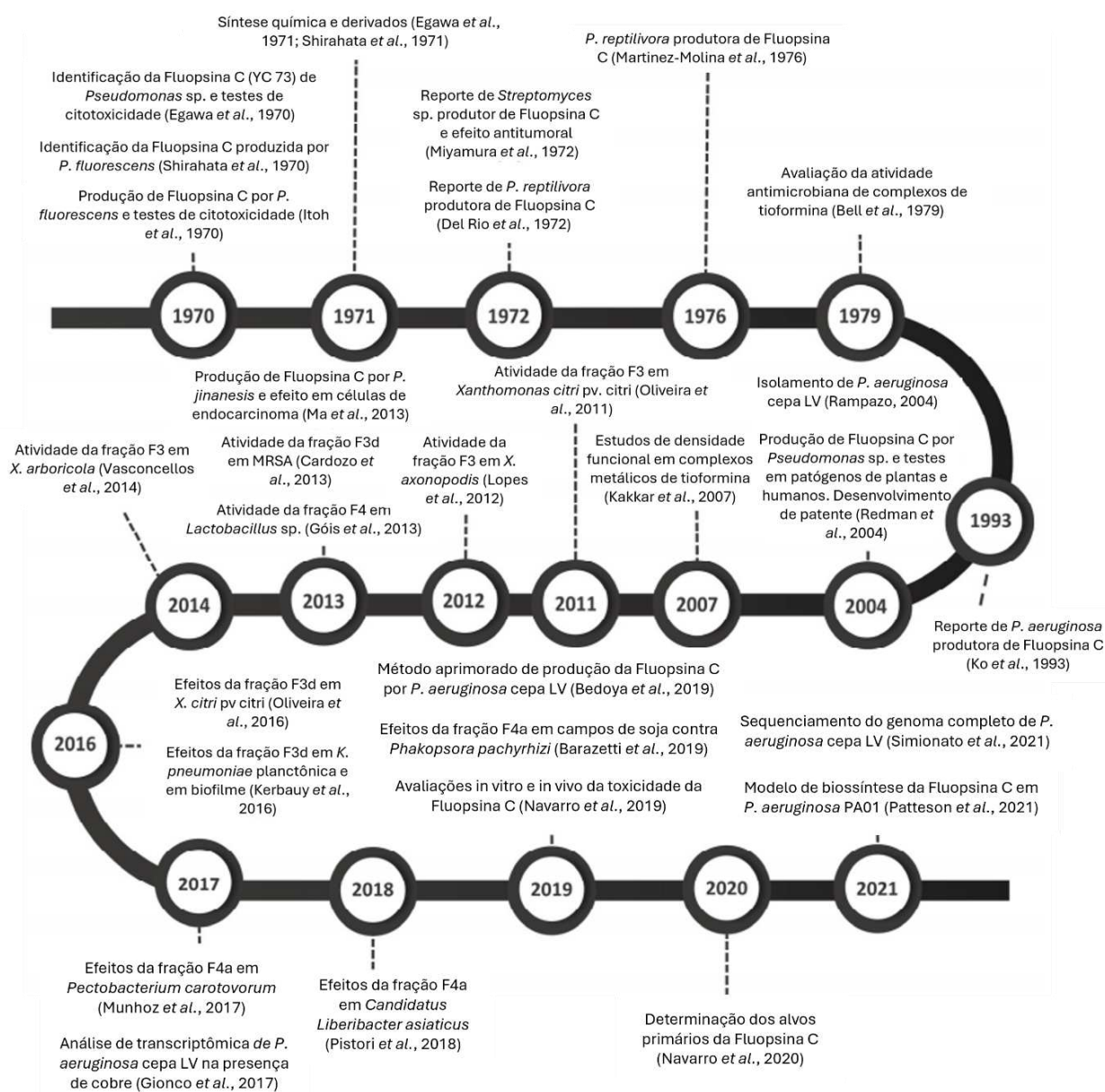
7 Além disso, foi identificado posteriormente como componente
8 principal de determinadas frações semipurificadas (F3, F3d, F4, F4a) com atividade
9 antimicrobiana em diversos estudos ao longo dos anos (Figura 3) (Oliveira *et al.*, 2011;
10 Lopes *et al.*, 2012; Cardozo *et al.*, 2013; Góis *et al.*, 2013; Vasconcellos *et al.*, 2014;
11 Oliveira *et al.*, 2016; Kerbauy *et al.*, 2016; Munhoz *et al.*, 2017; Pistori *et al.*, 2018;
12 Barazetti *et al.*, 2019). Possui atividade antimicrobiana de amplo espectro contra
13 patógenos humanos e fitopatógenos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos,
14 além de atividade antitumoral (Afonso *et al.*, 2022).

15 Os estudos com a Fluopsina C diminuíram após a década de 1970
16 devido os pesquisadores considerarem sua elevada toxicidade um empecilho para
17 seu uso clínico, sugerindo que novas tecnologias eram necessárias para compor sua
18 formulação (Egawa *et al.*, 1970). Contudo, em 2004, Rampazo isolou uma cepa
19 ambiental de *P. aeruginosa* (cepa LV, derivada de “Lesão velha”), de uma lesão foliar
20 de *Citrus sinensis* var. *valencia*, e isso trouxe à tona novamente às pesquisas da
21 Fluopsina C.

22 Com um novo cenário, onde se buscam novos compostos viáveis para
23 o combate à RA, os estudos com a Fluopsina C se atualizam a cada ano, tanto para
24 o uso clínico como agrícola, voltando a ter notoriedade 50 anos após sua descoberta
25 (Alves de Lima *et al.*, 2022; Afonso *et al.*, 2022).

26

1

2 **Figura 3 – Histórico de estudos relacionados à Fluopsina C.**

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

Fonte: adaptado de Afonso *et al.*, (2022).

Após o isolamento de *P. aeruginosa* cepa LV (GenBank CP058323), ela se tornou a produtora de Fluopsina C mais estudada das últimas 2 décadas, havendo diversos estudos sobre sua atividade (Figura 3) (Simionato *et al.*, 2021). O isolamento da bactéria pelo grupo de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, do Laboratório de Ecologia Microbiana (Rampazo, 2004), foi a partir de um pomar onde havia sido feita a pulverização de cloreto de cobre para controle do cancro cítrico (Afonso *et al.*, 2022).

1 O contexto de seu isolamento, na cidade de Astorga, Paraná, indicou
2 o mecanismo de produção desta molécula, como um mecanismo de biorremediação
3 contra o cloreto de cobre, o que torna a Fluopsina C um quelato de cobre (Afonso *et*
4 *al.*, 2022). Assim, a presença de cobre nos meios de cultura é um “gatilho” para
5 produção *in vitro* de Fluopsina C. Gionco e colaboradores (2017) indicaram nove
6 genes hiperexpressos na presença de cobre, tais como genes que codificam
7 transportadores de íons metálicos, reguladores transcricionais, proteínas não
8 identificadas e aquelas que participam na biossíntese de fenazinas.

9 Enquanto a Fluopsina C tem atividade antimicrobiana de amplo
10 espectro contra leveduras e bactérias, as cepas de *P. aeruginosa* que a sintetizam
11 são capazes de resistir à sua ação até a concentração de 15 a 70µg/mL (Patteson *et*
12 *al.*, 2021). Um ponto positivo quanto a isso é a dificuldade das bactérias selecionarem
13 mecanismos de resistência à Fluopsina C, mesmo após múltiplas exposições à
14 pressão seletiva (Navarro *et al.*, 2019). Entretanto, negativamente, há uma limitação
15 quanto à concentração máxima de produção deste composto, uma vez que a
16 otimização máxima de produtividade possível é condicionada a susceptibilidade da
17 cepa ao próprio antimicrobiano (Bedoya *et al.*, 2019).

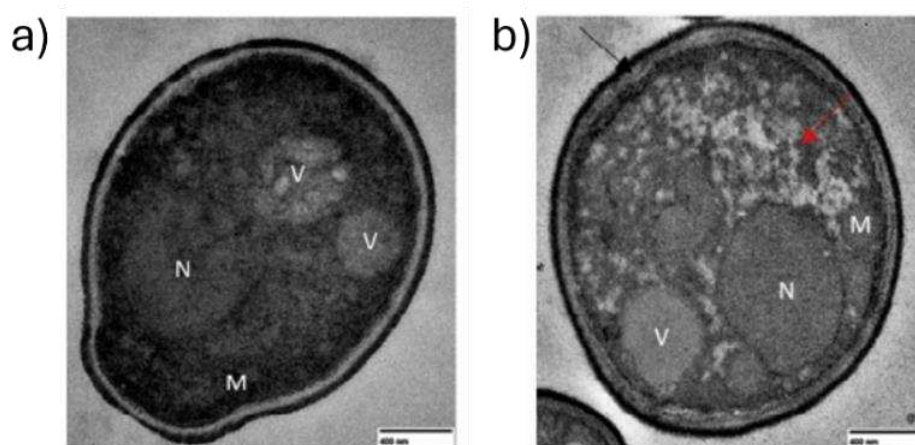
18 A hipótese atual é que a Fluopsina C tem na membrana citoplasmática
19 bacteriana seu principal local de ação, tanto em Gram-positivas como Gram-
20 negativas, tornando-as mais permeáveis (Navarro *et al.*, 2020). Um efeito secundário
21 identificado por Navarro e colaboradores (2020) foi a dissolução do anel Z,
22 provavelmente devido à quebra de potencial de membrana, inibindo a septação e
23 assim prejudicando a divisão celular, porém sem danos ao material genético. O
24 trabalho de Spoladori e colaboradores (2023) contribui para este entendimento, uma
25 vez que, ao avaliar resultados inibitórios contra *Candida auris*, reportou efeitos de
26 desorganização citoplasmática e descolamento da membrana celular fúngica (Figura
27 4) (Spoladori *et al.*, 2023).

28 Navarro e colaboradores (2019) observaram o efeito da Fluopsina C
29 na morfologia microbiana de *K. pneumoniae* e *S. aureus* sob microscopia eletrônica.
30 Foi visualizado alterações de forma, com acentuadas depressões, matriz extracelular
31 diminuída, ruptura celular visível, além de alteração citoplasmática e vacuolização
32 (Figura 5).

33 Junto à sua descoberta, Egawa e colaboradores (1970) avaliaram sua
34 citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, obtendo dose letal de 50% (DL₅₀) de 3 a 6 mg/kg para

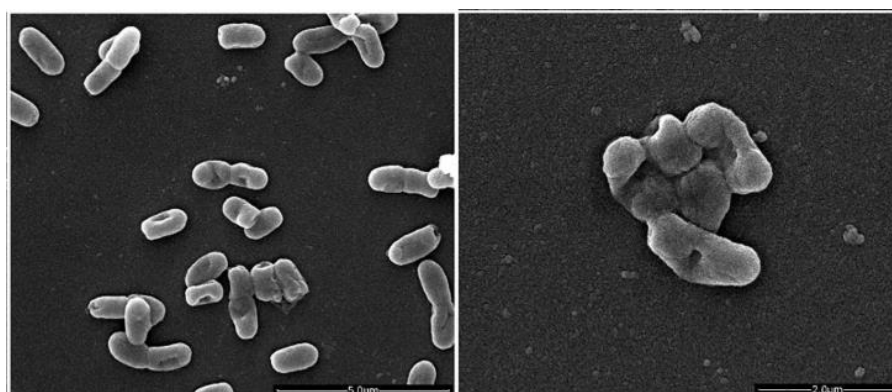
1 camundongos (linhagem não especificada). Estudos posteriores corroboram esse
2 dado, onde a concentração citotóxica da Fluopsina C capaz de inibir a viabilidade de
3 50% (CC₅₀) das células LLC-MK2 (células epiteliais renais de *Macaca mulatta*) e em
4 glóbulos vermelhos foi de 2,0 µg/mL, e DL₅₀ em camundongos Swiss de 4 mg/kg
5 (Navarro *et al.*, 2019). Este valor também é próximo ao da Concentração Inibitória
6 Mínima (CIM) para células de *C. auris* descrita por Spoladori e colaboradores (2023).

7
8 **Figura 4** – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células de *C. auris*
9 depois de 24 horas, sem tratamento (a) e tratadas com 3,12 µg/mL de F4a, fração
10 semipurificada de Fluopsina C. Núcleo (N); vacúolo (V); mitocôndria (M);
11 desorganização citoplasmática (seta vermelha); descolamento da membrana celular
12 (seta preta).



13
14 **Fonte:** Spoladori *et al.*, 2023.

15
16 **Figura 5** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de células de *K.*
17 *pneumoniae* tratadas com Fluopsina C após 1 hora de exposição, evidenciando
18 pontos de depressões na forma celular bacteriana.



19
20

1 **Fonte:** Navarro *et al.*, 2019.

2
3 A toxicidade avaliada em larvas de *Tenebrio molitor* apresentou taxas
4 de mortalidade de 20 e 42% para concentrações de 0,25 e 0,5 µg para Fluopsina C
5 purificada, respectivamente, sendo que todas as larvas morreram quando tratadas
6 com 1 e 2 µg após 96 horas (Navarro *et al.*, 2019).

7 Mesmo que outros trabalhos não tenham reportado danos ao material
8 genético, Alves de Lima e colaboradores (2022) em seu estudo com células oncóticas
9 MCF-7, identificou genotoxicidade na concentração de 1 µM onde houve indução de
10 quebras na cadeia de DNA após 3 horas de exposição. Além disso, foi observada
11 inibição da atividade metabólica mitocondrial, indicando ser mais um modo de ação
12 da Fluopsina C em células eucarióticas. Em concordância com os achados em
13 procariotos, os autores também observaram interrupção do ciclo celular em G1,
14 provavelmente pela quebra de potencial de membrana já descrita (Navarro *et al.*,
15 2020).

16 Kerbauy e colaboradores (2016) testaram a fração semipurificada F3d
17 contra 69 isolados MDR-Kp, tanto produtores de KPC como resistentes à colistina e
18 polimixina B, inclusive em condições de biofilme. Todos os isolados apresentaram
19 sensibilidade no teste de disco de difusão, com dados de inibição variando de 12 a
20 23mm, enquanto, a CIM foi de 62,5 µg/mL, onde eliminou completamente as bactérias
21 após 14 horas de incubação. Hoje sabemos que esta fração possui como composto
22 principal responsável pela sua atividade antimicrobiana a Fluopsina C, nomeada
23 anteriormente como OAC (composto antimicrobiano organocúprico), foi testada para
24 os mesmos isolados, resultando num efeito muito mais acentuado, com CIM de 1,95
25 a 3,9 µg/mL.

26 Com tais dados promissores, Navarro e colaboradores (2019)
27 prosseguiram com os testes para MDR-Kp com a Fluopsina C purificada, observando
28 CIM de 2 µg/mL, resultado comparável a antimicrobianos comerciais, como
29 vancomicina, linezolidina, teixobactina e daptomicina. Tal concentração não gerou
30 efeitos tóxicos evidentes *in vitro*. Na testagem *in vivo* em camundongos, o mesmo
31 grupo observou para a concentração de 2 mg/kg congestão moderada dos vasos
32 hepáticos, infiltração inflamatória, hemorragia e acentuada vacuolização
33 citoplasmática em todos os momentos de análise.

34 Além de MDR-Kp, há estudos sobre a atividade da Fluopsina C contra

1 *S. aureus* resistente à metilina (Cardozo *et al.*, 2013) e *A. baumannii* (Gionco, 2016),
2 inclusive em cepas extensivamente resistentes a antimicrobianos (Afonso *et al.*,
3 2024).

4 Autores que estudaram o efeito antimicrobiano da Fluopsina C
5 destacam a potente atividade da molécula (Spoladori *et al.*, 2023). Contudo, reforçam
6 que é necessário esforços para a redução da toxicidade para células de mamíferos,
7 sugerindo a utilização de sistemas de liberação de fármacos. Vale lembrar também,
8 que vários medicamentos (como a colistina, polimixina B e vancomicina) possuem
9 toxicidade conhecida semelhante à Fluopsina C, mas têm sido utilizados para
10 combate de infecções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos
11 (Sharma, 2020).

12 A disponibilidade da Fluopsina C no sangue também se mostrou como
13 um ponto para melhoria. Até o momento não há relatos de estudos quanto a
14 biodisponibilidade, farmacocinética ou vias de metabolização da Fluopsina C. Em seu
15 trabalho, Navarro e colaboradores (2019) sugeriram que há uma rápida metabolização
16 pelo organismo e possivelmente ocorre a transformação para uma molécula diferente,
17 ou ainda o composto pode ter alta afinidade à membrana, ambas possibilidades
18 dificultando sua detecção.

19 3.4.1 Atividade antimicrobiana do Cobre

20 Todas as formas de cobre induzem graus de toxicidade em
21 organismos vivos, contudo essa toxicidade permite suas aplicações, tanto
22 antimicrobiana como antitumoral (Ameh e Sayes, 2019). Portanto, ao compreender a
23 toxicidade proveniente do cobre, têm-se um entendimento sobre os compostos que o
24 possuem.

25 Nanopartículas de cobre (CuNPs) são frequentemente utilizadas em
26 aplicações agrícolas, principalmente como pesticidas auxiliando no controle de
27 patógenos. O mecanismo de ação que permite essa utilização é semelhante à ação
28 da Fluopsina C, pela ligação à parede celular, diminuindo a integridade da membrana,
29 o que induz o extravazamento do conteúdo intracitoplasmático (Ameh e Sayes, 2019).

30 O mecanismo com o qual as CuNPs entram nas células geralmente
31 envolve difusão direta através da membrana celular, facilitado via canais iônicos ou
32 transporte ativo. Uma vez dentro das células, essas nanopartículas interagem com

1 organelas como as mitocôndrias, gerando espécies reativas de oxigênio e assim,
2 perturbando as funções celulares fisiológicas (Taylor *et al.*, 2020). Isso leva tanto à
3 atividade antimicrobiana como à citotoxicidade (Ameh e Sayes, 2019; Kumar *et al.*,
4 2021). Entretanto, a literatura disponível indica que a exposição ao cobre não é
5 cancerígena, mutagênica ou induz efeitos reprodutivos ou gestacionais (Taylor *et al.*,
6 2020).

7 A Agência de Proteção Ambiental dos EUA não estabelece uma dose
8 de referência de exposição oral ou inalatória crônica para o cobre. Dessa forma, há
9 poucas avaliações de risco disponíveis para que os efeitos da exposição ao cobre
10 sejam notadas (Ameh e Sayes, 2019). Entretanto, em uma análise de dose ideal com
11 menor potencial de risco à saúde resulta em 0,04 mg Cu/kg/dia (Taylor *et al.*, 2020).

12 O acúmulo de cobre pode ocorrer nos rins, fígado e baço de roedores,
13 sendo que o excesso de cobre no fígado pode interromper a função hepática normal,
14 além de causar nefrite e necrose dos túbulos renais (Chen *et al.*, 2006). A maior parte
15 do cobre em animais tratados com CuNPs foi encontrado em amostras fecais,
16 indicando que o cólon é responsável por eliminar o cobre não absorvido, já íons de
17 cobre geralmente são eliminados através dos rins pela urina (Ameh e Sayes, 2019;
18 Taylor *et al.*, 2020) Dentre a citotoxicidade relacionada aos rins, incluem danos às
19 células epiteliais tubulares renais, aumento do espaço de Bowman e necrose tubular
20 (Ameh e Sayes, 2019).

21 Em um estudo há longo prazo em peixes, após 21 dias de exposição
22 houve vacuolização e necrose do fígado, além de lipidose hepática, sugerindo
23 redistribuição do cobre para o fígado e hepatotoxicidade retardada (Malhortra *et al.*,
24 2020). Esses dados indicam que a intensidade das alterações histológicas no fígado
25 aumenta gradualmente com a concentração e tempo de exposição, tempo este que é
26 insuficiente em administrações para finalidade clínica (Malhortra *et al.*, 2020). Sendo
27 que a recuperação branquial em peixes pós exposição ao cobre se deu em 45 dias
28 sem contato, e em 14 dias os efeitos da toxicidade ainda não haviam iniciado a
29 reversão (Malhortra *et al.*, 2020).

30 Tendo essa atividade concomitantemente à toxicidade, visando
31 remediar ou minimizar os efeitos citotóxicos da Fluopsina C, técnicas de
32 encapsulamento em nanopartículas lipossomais foram realizadas. O propósito é
33 desenvolver um sistema lipossomal de Fluopsina C para liberação do ativo de forma
34 controlada, segura e eficiente.

1 3.5 DRUG DELIVERY SYSTEMS

2 “Drug delivery systems” (sistemas de liberação de fármacos) é uma
3 denominação genérica utilizada para englobar diversas estratégias e técnicas para
4 encapsulação de fármacos e demais compostos ativos. Tais sistemas apresentam
5 inúmeras vantagens, como a liberação progressiva e controlada do fármaco,
6 diminuição da toxicidade em tecidos não-alvo, maior tempo de permanência na
7 circulação sanguínea, necessitando de um menor número de doses para manutenção
8 da dose terapêutica, estabilização do composto ativo, administração segura
9 (diminuição de reações inflamatórias locais), entre outras (Zucker *et al.*, 2009; Yang
10 *et al.*, 2013; Son, Lee e Cho, 2017).

11 Muitos compostos atualmente apresentam baixa solubilidade aquosa
12 (grupos 2 ou 4 do sistema de classificação biofarmacêutica), o que limita sua absorção
13 no corpo e reduz sua biodisponibilidade oral. Para tornar esses compostos seguros e
14 eficazes para o tratamento, vários fatores, incluindo biodisponibilidade, toxicidade e
15 disposição corporal devem ser considerados (Son, Lee e Cho, 2017). Porém, o
16 aprimoramento via sistemas de liberação de fármacos com liberação controlada tem
17 revolucionado o desenvolvimento de novas formulações (Machado, Gnoatto e
18 Klüppel, 2007; Bulbake *et al.*, 2017).

19 Nesse meio, a utilização de materiais nanoparticulados no tratamento
20 de doenças infecciosas tem sido objeto de grande interesse nos últimos tempos, uma
21 vez que os antimicrobianos disponíveis para o tratamento de infecções MDR são
22 limitados (Imran, *et al.*, 2022). As nanopartículas podem ser categorizadas de duas
23 maneiras: orgânicas (por exemplo, à base de lipídios) ou inorgânicas (por exemplo,
24 nanopartículas de metais). Vale destacar nesse contexto as nanopartículas orgânicas,
25 onde foi relatado o aumento da biodisponibilidade de medicamentos, melhorando a
26 penetração e a distribuição de medicamentos, assim como a atividade antibacteriana
27 (Imran, *et al.*, 2022).

28 3.5.1 Lipossomas

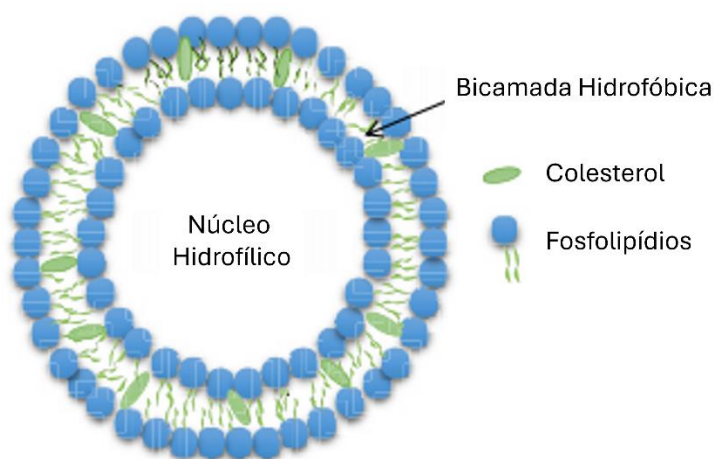
29 Os lipossomas são os nanocarreadores mais explorados e utilizados
30 em sistemas de direcionamento de administração de medicamentos (Nsairat *et al.*,
31 2022). Descobertos em 1965, os lipossomas são vesículas esféricas formadas por

1 uma ou mais bicamadas de membrana fosfolipídica anfipática, podendo se organizar
2 em uma série concêntrica de múltiplas camadas, circundando uma área interna
3 aquosa (Wang e Grainger, 2019; Liu, Chen e Zhang, 2022). São biocompatíveis,
4 biodegradáveis, capazes de encapsular e transportar diversas moléculas, tais como
5 medicamentos, cosméticos e ingredientes alimentícios, permitindo sua liberação
6 diferenciada (Panahi *et al.*, 2017; Imran *et al.*, 2022).

7 Geralmente formados de moléculas anfifílicas, possuem uma
8 cabeça hidrofílica, cauda hidrofóbica e cadeias de hidrocarbonetos, exemplos
9 frequentes de lipídios usados são a fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e colesterol
10 (Figura 6) (Li *et al.*, 2019). Os lipossomas são montados usando a tendência natural
11 dos fosfolipídios para formar membranas quando dispersos em meio aquoso, devido
12 a interações hidrofóbicas entre suas cabeças lipídicas e as forças de van der Waals
13 que ligam suas caudas de hidrocarbonetos (Gonzalez Gomez e Hosseinidoust, 2020).
14 Eles podem ser classificados, de acordo com suas aplicações e composições, em
15 lipossomas carregados, convencionais, furtivos (longa duração), ativamente
16 direcionados, responsivos à estímulos e lipossomas de bolha (Nsairat *et al.*, 2022).

17

18 **Figura 6** – Representação esquemática da bicamada lipossomal.



19

20

Fonte: adaptado de Nsairat *et al.*, 2022.

21

22 O encapsulamento por lipossomas permite proteção aos ativos da
23 degradação fisiológica, liberação controlada e prolongamento da meia-vida do
24 composto, reduzindo a toxicidade e promovendo a otimização, assim como melhoria
25 no comportamento farmacocinético e solubilidade do medicamento (Li *et al.*, 2019;
26 Khan *et al.*, 2020; Catalano *et al.*, 2022). Pode ser utilizado para encapsulamento tanto

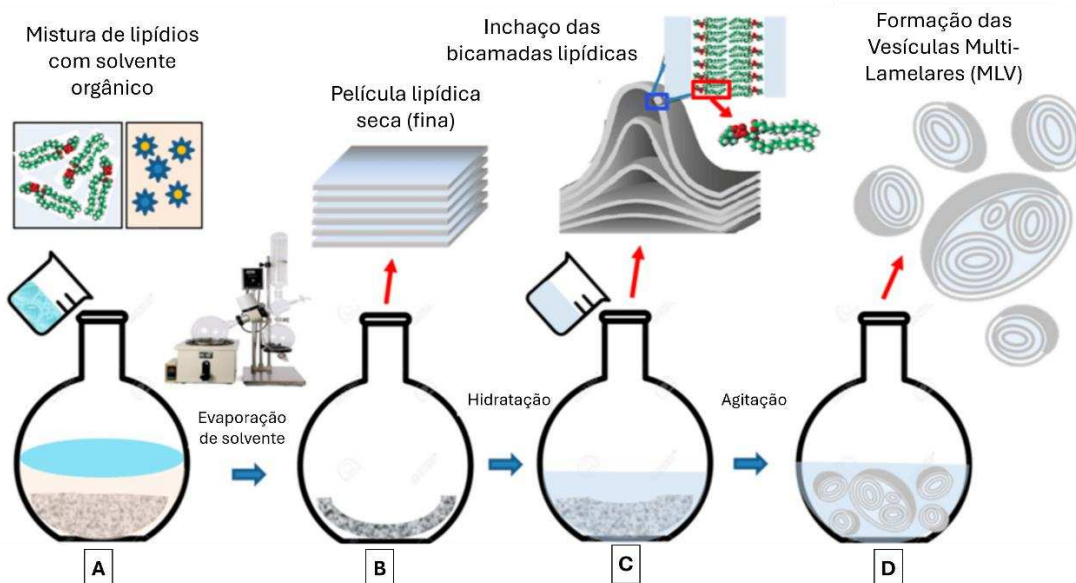
1 de compostos hidrofílicos como hidrofóbicos, uma vez que pode aprisionar as
2 moléculas em seu interior aquoso ou em sua membrana lipofílica (Nsairat *et al.*, 2022).
3 O direcionamento para entrega seletiva de sua carga a um local alvo pode ocorrer de
4 modo passivo ou ativo, diminuindo o efeito colateral sistêmico, elevando a dose
5 máxima tolerada e melhorando benefícios terapêuticos (Liu, Chen e Zhang, 2022).

6 A preparação dos lipossomas pode ocorrer por diversos métodos:
7 hidratação de película fina (Método Bangham), dupla emulsificação, injeção de
8 solvente e preparação *in situ* (Liu, Chen e Zhang, 2022).

9 Seu preparo envolve, resumidamente, quatro etapas: secagem do
10 filme lipídico, formação das vesículas em meio aquoso, redução do tamanho e sua
11 purificação (Gonzalez Gomez e Hosseinidoust, 2020). A preparação pela técnica
12 tradicional de hidratação em película fina consiste, inicialmente, na dissolução de
13 lipídios em solvente orgânico com posterior evaporação do solvente orgânico,
14 formando um filme lipídico (Figura 7.A) (Liu, Chen e Zhang, 2022; Lombardo e Kiselev,
15 2022). Essa película é então hidratada e suspendida em um meio aquoso, geralmente
16 tampão fosfato em pH 7,4, onde eles se organizam e formam vesículas com uma ou
17 mais bicamadas (Figura 7.B) (Khan *et al.*, 2020; Lombardo e Kiselev, 2022).

18 Durante a hidratação aquosa do filme lipídico, ocorre a agitação
19 mecânica, seja manual ou por vórtice, e em seguida usa-se alguma estratégia para
20 padronização de tamanho das vesículas, que podem variar de 20nm a 1-2 μ m (Liu,
21 Chen e Zhang, 2022; Khan *et al.*, 2020). Entre as estratégias mais comuns estão a
22 sonicação, extrusão, prensa francesa (extrusão em alta pressão), homogeneização
23 ou microfluidização, sendo que a extrusão e homogeneização de alta pressão são as
24 mais populares na indústria farmacêutica (Khan *et al.*, 2020; Liu, Chen e Zhang, 2022).

25
26 **Figura 7** – Representação esquemática dos principais estágios do método de
27 hidratação de película fina de preparação de lipossomas. Os componentes lipídicos
28 são dissolvidos em solvente orgânico (A); após a evaporação do solvente, uma
29 película lipídica seca (fina) é formada (B). A película é então reidratada em um tampão
30 salino causando um inchaço das bicamadas lipídicas (C), por fim, a agitação da
31 amostra favorece a formação de vesículas multilamelares (D).



Fonte: adaptado de Lombardo e Kiselev (2022).

Através da extrusão, os lipossomas de tamanhos grandes passam por uma membrana de policarbonato ou filtro cerâmico, assim as vesículas maiores são rompidas pela pressão na entrada do poro e reorganizadas durante a passagem, e ao longo dos ciclos as vesículas ficam menores (Liu, Chen e Zhang, 2022). Por fim, pode ser realizada a centrifugação, diálise, filtração ou cromatografia em coluna para isolar os lipossomas de seu meio aquoso circundante, além da caracterização química do produto (Gonzalez Gomez e Hosseinidoust, 2020; Khan *et al.*, 2020; Lombardo e Kiselev, 2022).

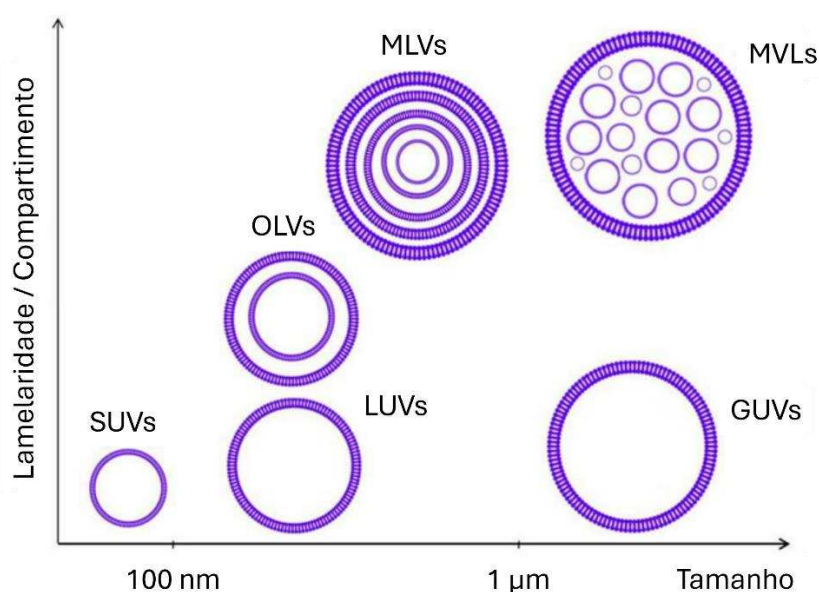
Embora seja a técnica mais tradicional, por hidratação em película fina, os produtos comerciais AmBisome, Visudyne e Shingrix a utilizam em sua fabricação. Por exemplo, Visudyne (fotossensibilizador) é fabricado através da evaporação de filme lipídico em diclorometano, hidratação com solução de lactose, redução de tamanho por homogeneização, filtração e liofilização (Liu, Chen e Zhang, 2022).

Os lipossomas também podem ser classificados de acordo com seu tamanho, que guia também o arranjo de sua estrutura interna vesicular. Dependendo de sua estrutura de compartilhamento e lamelaridade, pode ser classificada em vesículas unilamelares grandes (LUVs), vesículas oligolamelares (OLVs), vesículas multilamelares (MLVs) e lipossomas multivesiculares (MVLs) (Figura 8) (Liu, Chen e Zhang, 2022; Nsairat *et al.*, 2022). E com base no tamanho da vesícula lipossomal, podem ser classificados como vesículas unilamelares pequenas (SUVs, 30–200 nm),

1 vesículas unilamelares grandes (LUVs, 200–500 nm) e vesículas unilamelares
2 gigantes (GUVs, > 1000 nm) (Figura 8) (Liu, Chen e Zhang, 2022).

3

4 **Figura 8** – Categorias dos lipossomas de acordo com estrutura interna e tamanho da
5 vesícula. SUVs: pequenas vesículas unilamelares; LUVs: vesículas unilamelares
6 grandes; OLVs: vesículas oligolamelares; MLVs: vesículas multilamelares; MVLs:
7 lipossomas multivesiculares; GUVs: vesículas unilamelares gigantes.



8

9

Fonte: adaptado de Liu, Chen e Zhang, 2022.

10

11 A incorporação do colesterol é indispensável para a formulação
12 lipossomal (Figura 6), em especial para as que utilizam fosfolipídios insaturados, como
13 a fosfatidilcolina de soja ou ovo (Lombardo e Kiselev, 2022). Ele é responsável por
14 aumentar a estabilidade das vesículas e promover o empacotamento das cadeias
15 lipídicas, modulando a fluidez da bicamada e com isso sua permeabilidade, além de
16 interromper a cristalização das cadeias acil dos fosfolipídios (Panahi *et al.*, 2017; Liu,
17 Chen e Zhang, 2022; Nsairat *et al.*, 2022).

18

19 Adicionalmente, o colesterol cria um obstáculo estérico ao seu
20 movimento, tornando o lipossoma mais estável, diminuindo a permeabilidade da
21 membrana lipídica aos solutos o que reduz o vazamento do composto encapsulado,
22 assim como pode reduzir o dano causado à bicamada pelo resfriamento (Panahi *et al.*,
23 *et al.*, 2017; Wang e Grainger, 2019). Contudo, foi relatado que o “efeito de
condensação” ou “efeito de ordenação” do colesterol ocorre em concentrações de 5 a

1 30% da constituição do filme lipídico (Liu, Chen e Zhang, 2022).

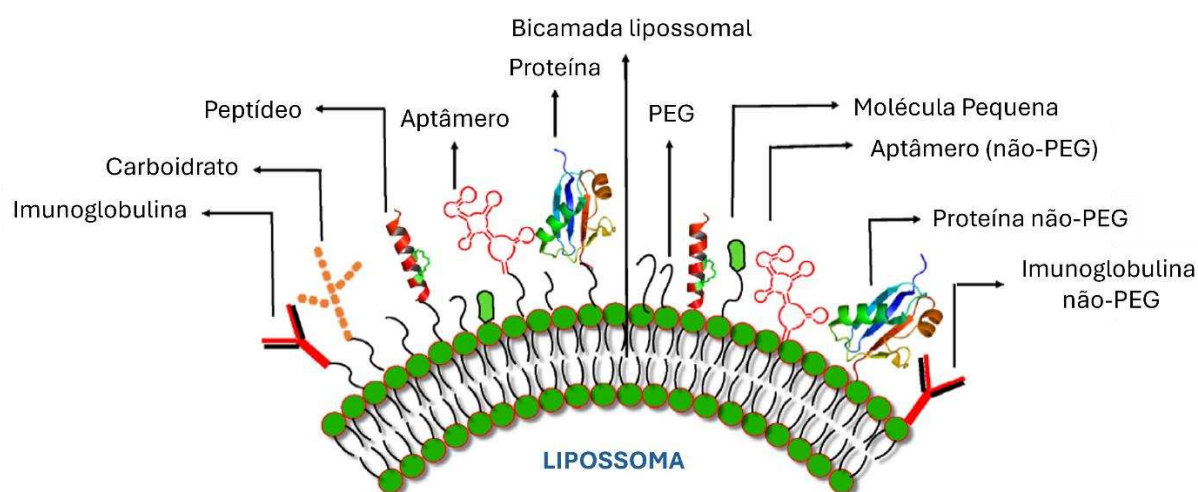
2 Os lipossomas convencionais (de 1ª geração), descobertos no
3 início dos estudos sobre o tema, não são imunologicamente inertes, como
4 originalmente proposto, sendo facilmente degradados pelo Sistema Fagocitário
5 Mononuclear (SFM) após sua opsonização (Li *et al.*, 2019; Wang e Grainger, 2019;
6 Khan *et al.*, 2020). Isso resulta no curto tempo de vida na circulação intravenosa e
7 rápida diminuição na concentração do fármaco no sangue, e posterior acúmulo no
8 fígado e baço (Li *et al.*, 2019; Nsairat *et al.*, 2022). Isso vai contra o que se quer ao
9 utilizar-se desta técnica. Portanto, os lipossomas furtivos ou de longa duração são os
10 mais utilizados (Nsairat *et al.*, 2022).

11 Algumas tentativas de êxito para o prolongamento do tempo de meia-
12 vida dos lipossomas de 1ª geração na circulação foram a substituição da
13 esfingomiéline por fosfatidilcolina, devido ao aumento da hidrofiliidade da superfície,
14 assim como a adição de colesterol para reduzir o vazamento (Allen e Cullis, 2013;
15 Gonzalez Gomez e Hosseinidoust, 2020). Contudo, ainda não atingem os critérios de
16 benefícios necessários para sua utilização generalizada.

17 Os lipossomas de longa duração (ou furtivos) são lipossomas
18 modificados de acordo com sua aplicação. Eles possuem sua superfície revestida com
19 moléculas poliméricas hidrofílicas inertes, como oligossacarídeos, vitaminas,
20 enzimas, anticorpos, glicoproteínas e polímeros sintéticos, conjugados aos lipídeos
21 (Figura 9) (Li *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2020).

22

23 **Figura 9** – Possibilidades de modificações da superfície lipossomal.



24

25

Fonte: adaptado de Khan *et al.*, 2020.

1
2 Apesar de que diversas moléculas sejam interessantes para o
3 direcionamento ativo (visando um alvo específico *in vivo*), até o momento nenhum
4 fármaco lipossomal direcionado está disponível comercialmente (Caracciolo, 2018).
5 Muitos testes foram realizados visando comprovar os benefícios do direcionamento
6 ativo, mas até então poucos ensaios mostraram melhorias no tempo de circulação dos
7 lipossomas (Allen e Cullis, 2013).

8 Entre as moléculas mais utilizadas para estabilizar os lipossomas,
9 está o polietilenoglicol (PEG). Essa categoria de lipossomas é chamada estabilizada
10 “Stealth” (PEGuilados) e possuem o PEG ligado a fosfolipídios em sua constituição
11 (Nsairat *et al.*, 2022). O PEG de alto peso molecular proporciona que haja forças
12 repulsivas na superfície do lipossoma, conferindo impedimento estérico e criando uma
13 camada de hidratação (semelhante ao visto anteriormente com a fosfatidilcolina), com
14 isso há redução da adsorção pelas proteínas do sangue, as opsoninas (Wang e
15 Grainger, 2019; Liu, Chen e Zhang, 2022). Por consequência, reduz a ativação do
16 sistema complemento, impedindo a eliminação pelo SFM, o que prolonga o tempo de
17 circulação (Li *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2020). Contudo, a presença do PEG não impede
18 a opsonização, mas ainda é a abordagem de melhor eficiência para prevenir os efeitos
19 tanto para agregação como depuração pelo SFM (Caracciolo, 2018).

20 O PEG é um material biocompatível, além de melhorar a
21 estabilidade da membrana contribui para o desempenho geral da formulação
22 lipossomal. É uma substância não tóxica aprovada pelo FDA para uso farmacêutico,
23 assim como pela Agência de Medicamentos e Produtos de Saúde (MHPA) e EMA
24 (Weaver *et al.*, 2024). Além dos benefícios já citados, lipossomas PEGuilados exibem
25 taxas mais baixas de agregação e o PEG contribui para inibir a formação de cristais
26 de gelo durante o congelamento (Wang e Grainger, 2019). A maior estabilidade
27 biológica dos lipossomas pode ser obtida quando a concentração de PEG conjugado,
28 como o PEG-DSPE (polietilenoglicol associado a diesteroilfolfatidiletolamina), é de 2
29 a 7%, sendo que *in vivo* a concentração recomendada é de 5% (Liu, Chen e Zhang,
30 2022). Em proporções maiores que 8%, o PEG tende a formar suas próprias micelas
31 em vez de constituir a bicamada dos lipossomas (Liu, Chen e Zhang, 2022).

32 Ao contrário dos lipossomas convencionais, os PEGuilados têm
33 farmacocinética independente de dose, exceto em doses muito baixas (Allen e Cullis,
34 2013). Nesses casos, a injeção repetida de lipossomas PEGuilados pode ocasionar

1 na depuração sanguínea acelerada (fenômeno ABC - *Accelerated Blood Clearance*),
2 associada ao aumento do reconhecimento e remoção sistêmica lipossomal pela
3 produção de anticorpos IgM (Wang e Grainger, 2019; Liu, Chen e Zhang, 2022;
4 Weaver *et al.*, 2024). Outra resposta imune adversa associada a produção de
5 anticorpos anti-PEG IgM e IgG é a pseudo-alergia relacionada à ativação do
6 complemento (CARPA), causando reações de hipersensibilidade ao instigar células
7 imunes, como neutrófilos e basófilos (Lombardo e Kiselev, 2022; Weaver *et al.*, 2024).
8 Apesar dos efeitos negativos descritos acima, têm-se que os benefícios da adição do
9 PEG às formulações lipossomais anulariam tais efeitos, principalmente ao considerar
10 a exposição diária da população à ampla gama de produtos cosméticos que levam
11 PEG em sua formulação (Weaver *et al.*, 2024).

12 Por fim, ao finalizar a produção de qualquer formulação lipossomal é
13 aconselhado realizar a caracterização para verificar a padronização das vesículas,
14 visando garantir a segurança para sua aplicação. Para isso, utiliza-se o espalhamento
15 dinâmico da luz (DLS) que fornece informações sobre a estrutura e propriedades
16 dinâmicas das nanopartículas em solução, sendo possível obter informações do
17 tamanho das partículas e medição do potencial zeta (Lombardo e Kiselev, 2022).

18 O potencial zeta (ζ) representa o potencial elétrico na interface da
19 vesícula, assim, pode-se estimar os efeitos eletrostáticos nos lipossomas, uma vez
20 que ele é regulado pela natureza e distribuição da carga superficial dos lipossomas
21 (Lombardo e Kiselev, 2022). Vale ressaltar que o potencial zeta não é a carga
22 superficial em si, sendo um indicador indireto desta para uma partícula coloidal,
23 contudo é amplamente dependente do pH e da força iônica do meio na qual estão
24 dispersas (Gonzalez Gomez e Hosseinidoust, 2020). Ainda assim, é o melhor
25 indicador da estabilidade coloidal dos lipossomas, predizendo sua biodistribuição,
26 farmacocinética e afinidade celular, expressando também o grau de repulsão
27 eletrostática entre as vesículas em uma dispersão (Gonzalez Gomez e Hosseinidoust,
28 2020; Lombardo e Kiselev, 2022).

29 Potenciais zeta elevados, sejam positivos ou negativos (> 20 mV ou
30 < -20 mV), representam partículas estabilizadas eletricamente, e com isso, têm menor
31 tendência de agregar-se (Gonzalez Gomez e Hosseinidoust, 2020; Wang *et al.*, 2020;
32 Lombardo e Kiselev, 2022). Além disso, lipossomas com carga negativa quando
33 presentes na circulação sanguínea interagem menos com outros componentes do
34 sangue carregados negativamente (Wang *et al.*, 2020). Por outro lado, os com carga

1 positiva tem maior interação com alvos em biofilme que, em geral, são carregados
2 negativamente (Wang *et al.*, 2020).

3 Um ponto de atenção para uso dos lipossomas é que requerem
4 considerações adicionais para aprovação de órgãos regulatórios. Essas formulações
5 lipídicas costumam ser dispersões aquosas que exibem instabilidade físicas e
6 químicas conhecidas que podem limitar seu uso generalizado ao reduzir a vida útil do
7 produto (Drulis-Kawa e Dorotkiewicz-Jach, 2010; Wang e Grainger, 2019). Essa
8 instabilidade ocorre durante o armazenamento de longo prazo, ocasionando
9 problemas de degradação que incluem oxidação de fosfolipídeos, hidrólise, agregação
10 ou fusão dos lipossomas, falta de redispersibilidade e vazamento de medicamentos
11 (Wang e Grainger, 2019). Nesse sentido, a estabilidade das formulações lipossomais
12 depende principalmente da composição lipídica, temperatura de armazenamento,
13 adição de agentes antioxidantes e liofilização (Drulis-Kawa e Dorotkiewicz-Jach,
14 2010).

15 A fusão e agregação de lipossomas ocorre de forma espontânea com
16 o tempo em condições aquosas, para contrapor isso, majoritariamente as formulações
17 lipossomais são liofilizadas (Eleraky *et al.*, 2020; Lombardo e Kiselev, 2022). A
18 liofilização é uma estratégia primária na redução dos riscos da estabilidade e melhoria
19 da vida útil dos medicamentos lipossomais, uma vez que a água pode favorecer
20 reações químicas indesejadas (Liu, Chen e Zhang, 2022; Lombardo e Kiselev, 2022).

21 Mas não só produtos lipossomais se utilizam desta técnica, mais da
22 metade dos produtos biofarmacêuticos aprovados pelo FDA atuais são liofilizados
23 (Wang e Grainger, 2019). Além do ponto de vista estrutural, a liofilização é necessária
24 para garantia da esterilidade, sendo a etapa final para muitos medicamentos
25 parenterais, em especial lipossomais onde esterilização térmica não é possível (Wang
26 e Grainger, 2019).

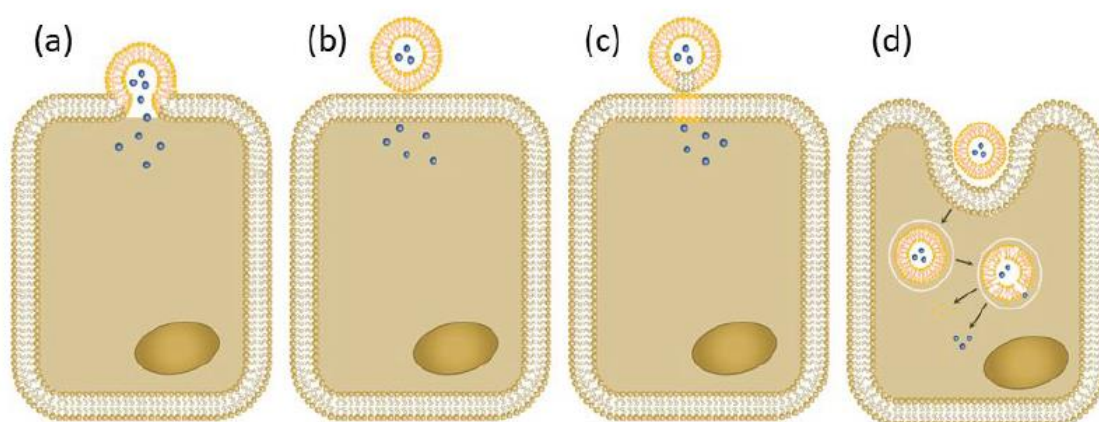
27 É desejado que um produto lipossomal liofilizado tenha uma
28 formulação em pó seca e estável (conhecida como lio-bolo ou lio-produto), tempos
29 curtos de reconstituição além de preservar a distribuição do tamanho das partículas,
30 potencial zeta de superfície próximas à formulação original (Wang e Grainger, 2019).
31 Essas características devem ser mantidas uma vez que influenciam o direcionamento,
32 reconhecimento, eliminação, opsonização e a imunogenicidade do lipossoma *in vivo*
33 (Wang e Grainger, 2019).

34 A interação dos lipossomas com a membrana celular é influenciada

1 por uma variedade de fatores, incluindo composição de membrana, diâmetro, carga
 2 superficial, ligante de superfície e o próprio ambiente biológico (Nsairat *et al.*, 2022).
 3 Essa interação pode ocorrer via fusão local (adesão) (Figura 10.A), adsorção (Figura
 4 10.B), troca lipídica entre membranas (Figura 10.C) ou endocitose específica
 5 (mediada por receptor) ou inespecífica (Figura 10.D) (Gonzalez Gomez e
 6 Hosseinidoust, 2020; Nsairat *et al.*, 2022). Seja qual for o processo de interação, a
 7 aderência das vesículas à superfície da célula está sujeita à interações eletrostáticas,
 8 de Van der Waals, e de hidratação, assim como é necessária certa perturbação local
 9 no empacotamento da parte externa de ambas bicamadas (Wang *et al.*, 2016).

10 É relevante dizer que a maior parte dos estudos focou na interação
 11 com células eucarióticas, contudo para procariotos pode haver diferenças. Por
 12 exemplo, o grau de fusão com membranas bacterianas depende da constituição da
 13 membrana, como a presença de fosfatidiletolamina que em *E. coli* é de 91% e *P.*
 14 *aeruginosa* 71% (Figura 11), que ditou a taxa de fusão, 66 e 41% respectivamente
 15 (Gonzalez Gomez e Hosseinidoust, 2020).

16
 17 **Figura 10** – Interação lipossomal com a bicamada lipídica celular. **A:** fusão dos lipídios
 18 lipossomais com os da membrana celular, liberando o conteúdo no interior celular. **B:**
 19 na adsorção os lipossomas são atraídos para a membrana celular por forças
 20 eletrostáticas promovendo a liberação do conteúdo. **C:** troca lipídica entre lipídios da
 21 membrana lipossomal e celular. **D:** pela endocitose as células fagocitárias envolvem
 22 o lipossoma e após sua destruição o conteúdo é liberado.



23
 24 **Fonte:** Gonzalez Gomez e Hosseinidoust, 2020.
 25

26 **Figura 11** – Interação lipossomal com *P. aeruginosa* vista por Microscopia eletrônica.



Fonte: Sachetelli *et al.*, 2000.

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

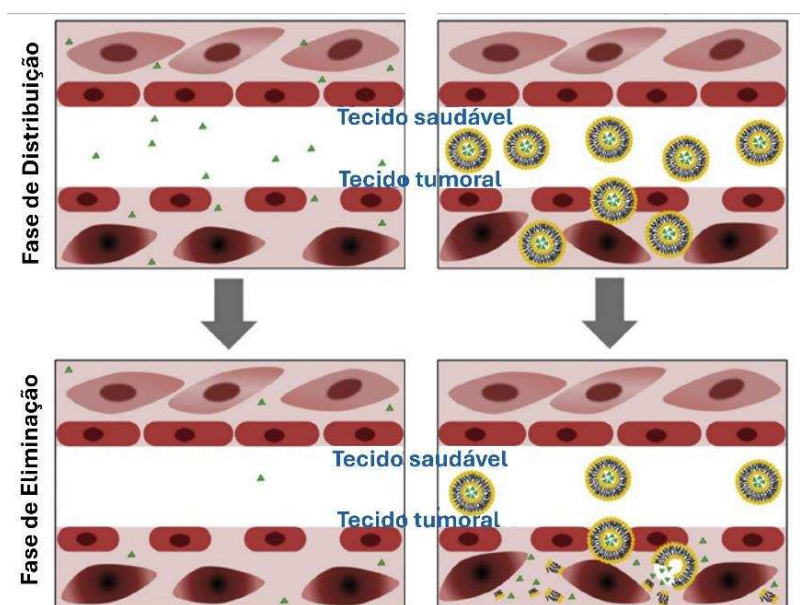
O primeiro medicamento lipossomal aprovado pelo FDA foi o Doxil® em 1995 (Li *et al.*, 2019). Após isso, foram mais de 500 ensaios clínicos registrados investigando produtos lipossomais, sendo mais de 40 produtos lipossomais comercializadas com sucesso (Li *et al.*, 2019; Wang e Grainger, 2019; Nsairat *et al.*, 2022). Já foram desenvolvidas formulações com diferentes vias de administração, por exemplo: parenteral, oral, transdérmica, nasal, pulmonar e oftálmica, no entanto, a maioria delas são injeções intravenosas ou intramusculares (Wang e Grainger, 2019; Liu, Chen e Zhang, 2022).

A maioria desses medicamentos concentra-se na terapia contra o câncer, mas também há em outras áreas como antimicrobianos, anestésias, vacinas, doenças pulmonares e terapia fotodinâmica (Liu, Chen e Zhang, 2022; Lombardo e Kiselev, 2022). Um exemplo muito conhecido e recente é a vacina anti-COVID-19 de mRNA desenvolvida pela Pfizer/BioNTech e Moderna já administrados em todo o mundo (Nsairat *et al.*, 2022). Outro exemplo que abre precedente regulatório para abordagens combinatórias lipossomais é o medicamento contra leucemia, Vyxeos®, que reúne no mesmo lipossoma a combinação de dois fármacos, daunorrubicina e citarabina (Li *et al.*, 2019).

Um medicamento amplamente beneficiado com essa técnica são os quimioterápicos, que geralmente possuem mecanismos de ação inespecíficos e grande volume de distribuição. Com este encapsulamento é possível a diminuição dos efeitos colaterais pelo direcionamento do acúmulo diretamente nos alvos, evitando órgãos saudáveis através do Efeito de Permeabilidade de Retenção (EPR) (Figura 12) (Li *et al.*, 2019).

1

2 **Figura 12** – Quimioterapia convencional (à esquerda) versus encapsulada em
3 lipossomas (à direita), beneficiando-se do Efeito de Permeabilidade de Retenção, em
4 tecido saudável e tumoral.



5

6

Fonte: adaptado de Li *et al.*, 2019.

7

8 O EPR ocorre pela necessidade de alta vascularização dos tecidos
9 tumorais, onde vasos sanguíneos são gerados rapidamente e muitas vezes com a
10 presença de fissuras (vasos fenestrados), podendo atingir de 100 a 780 nm, enquanto,
11 o normal está entre 5 e 10 nm (Li *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2020). O EPR não ocorre
12 apenas em tecidos tumorais sólidos, mas também em locais inflamatórios e
13 infecciosos, que também possuem capilares altamente porosos, de 100 nm a 2 μ m
14 (Daraee *et al.*, 2016; Liu, Chen e Zhang, 2022). Assim, os lipossomas, com tamanho
15 médio de 200 nm, utilizam dessas fissuras para “vazar” e se acumularem
16 passivamente nesses locais (Imagem 11) (Caracciolo, 2018; Liu, Chen e Zhang,
17 2022). Esse microambiente proporciona o direcionamento passivo dos lipossomas, e
18 tal efeito sobressai ao direcionamento ativo, não justificando, até então, os
19 investimentos em moléculas ligantes de superfície (Allen e Cullis, 2013; Khan *et al.*,
20 2020).

21 As formulações lipossomais também tem grande potencial como
22 carreadores de antimicrobianos no combate a RA, trazendo melhores resultados
23 terapêuticos para diversos modelos de infecções (inclusive, ICS) (Catalano *et al.*,

1 2022). Isso se deve por meio do aumento de tempo de meia-vida, solubilidade,
2 sinergismo entre compostos, redução da toxicidade e hemólise, por conta do
3 direcionamento de alvo (em especial passivo, via EPR), e, secundariamente, à melhor
4 adesão do paciente ao tratamento por conta do menor número de doses necessária
5 (Eleraky *et al.*, 2020; Catalano *et al.*, 2022). Tão importante quanto na luta contra a
6 RA, os lipossomas também fornecem proteção aos antimicrobianos contra
7 desativação enzimática, podendo até mesmo aumentar sua eficácia (Wang *et al.*,
8 2020). Outro fator de interesse é que, tais sistemas de liberação controlada pode
9 restringir a RA, uma vez que há menor exposição ao antimicrobiano,
10 consequentemente há menor incidência de expressão de enzimas, bombas de efluxo
11 ou espessamento da parede celular bacteriana (Eleraky *et al.*, 2020).

12 Todos os produtos lipossomais atuais aprovados pela FDA são
13 indicados para uso parenteral, e alguns como formas de dosagem lipossomais
14 liofilizadas como Ambisome®, Amphotec® e Visudyne®, portanto a via de
15 administração parenteral é atualmente preferida clinicamente para fármacos
16 lipossomais (Allen e Cullis, 2013; Wang e Grainger, 2019). Com o desenvolvimento
17 da ciência e tecnologia, cada vez mais os lipossomas serão amplamente utilizados na
18 clínica, desempenhando um papel importante no tratamento de várias doenças (Li *et*
19 *al.*, 2019).

20 Ademais, há diversos trabalhos ao longo dos anos buscando viabilizar
21 a produção de antimicrobianos novos e de uso comercial, em suas versões
22 lipossomais. Alguns exemplos são a amoxicilina (Weaver *et al.*, 2024), vancomicina
23 (Scriboni *et al.*, 2019; Werner *et al.*, 2024), polimixina B (Alipour *et al.*, 2008; Drulis-
24 Kawa e Dorotkiewicz-Jach, 2010; Kumar e Sharma, 2023); ciprofloxacina (Bakker-
25 Woudenberg *et al.*, 2001; Gubernator *et al.*, 2007); gentamicina (Schiffelers *et al.*,
26 2001; Gubernator *et al.*, 2007), norfloxacin (Ribeiro *et al.*, 2020), nafcilina (Alavi *et*
27 *al.*, 2022), tobramicina (Alarfaj *et al.*, 2022) e colistina (Mektrirat *et al.*, 2023). E outros
28 em desenvolvimento como S-thanatina (Fan *et al.*, 2015) e a Fluopsina C, neste
29 presente trabalho.

- 1 BEDOYA, J.C. *et al.* Enhanced Production of Target Bioactive Metabolites Produced
2 by *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain. **Biocatal. Agric. Biotechnol**, n. 17, p. 545–
3 556, 2019.
- 4 BELL, S. J.; FRIEDMAN, S. A.; LEONG, J. Antibiotic Action of N -
5 Methylthioformohydroxamate Metal Complexes. **Antimicrob. Agents Chemother**, n.
6 15, p. 384–391, 1979.
- 7 BORGHI, M.; PEREIRA, M. F.; SCHUENCK, R. P. The Presence of Virulent and
8 Multidrug-Resistant Clones of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in
9 Southeastern Brazil. **Current Microbiology**, v. 80, n. 9, p. 286, 2023.
- 10 BULBAKE, U. *et al.* Liposomal formulations in clinical use: an updated
11 review. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 2, p. 12, 2017.
- 12 BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for
13 beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents
14 and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.
- 15 CAMARGO, C. H. Current status of NDM-producing Enterobacterales in Brazil: a
16 narrative review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1339-1344,
17 2022.
- 18 CARACCILO, G. Clinically approved liposomal nanomedicines: lessons learned
19 from the biomolecular corona. **Nanoscale**, v. 10, n. 9, p. 4167-4172, 2018.
- 20 CARDOZO, V. F., *et al.* Antibacterial Activity of Extracellular Compounds Produced
21 by a *Pseudomonas* Strain against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
22 (MRSA) strains. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob**, v. 12, n. 12, 2013.
- 23 CARVALHO-ASSEF A. P., *et al.* Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in
24 Brazil. **J Antimicrob Chemother.**, v. 68, n. 12, p. 2956–2957, 2013.
- 25 CATALANO, A. *et al.* Multidrug resistance (MDR): A widespread phenomenon in
26 pharmacological therapies. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 616, 2022.
- 27 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Antibiotic
28 resistance threats in the United States**. Atlanta: CDC. 114 p., 2014.
- 29 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Antibiotic
30 Resistance Threats in the United States**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health
31 and Human Services, 2019.
- 32 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Special Report:
33 COVID-19 U.S. impact on antimicrobial resistance**. Atlanta, GA: U.S. Department
34 of Health and Human Services, 44p. 2022.
- 35 CHALLINOR, V. L.; BODE, H. B. Bioactive natural products from novel microbial
36 sources. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1, p. 82-97,
37 2015.
- 38 CHEN, X.; LI, B. How nature incorporates sulfur and selenium into bioactive natural

- 1 products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 76, p. 102377, 2023.
- 2 CHEN, Y. *et al.* Risk factors and mortality for elderly patients with bloodstream
3 infection of carbapenem resistance *Klebsiella pneumoniae*: a 10-year longitudinal
4 study. **BMC geriatrics**, v. 22, n. 1, p. 1-8, 2022.
- 5 CHEN, Z., *et al.* 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo*.
6 **Toxicol. Lett**, v. 163, n. 2, p. 109–120, 2006.
- 7 CHONG, Y.; SHIMODA, S.; SHIMONO, N. Current epidemiology, genetic evolution
8 and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and
9 *Klebsiella pneumoniae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, p. 185-188, 2018.
- 10 CONCEIÇÃO-NETO, O. C. *et al.* Polymyxin resistance in clinical isolates of *K.*
11 *pneumoniae* in Brazil: Update on molecular mechanisms, clonal dissemination and
12 relationship with KPC-producing strains. **Frontiers in Cellular and Infection**
13 **Microbiology**, v. 12, p. 898125, 2022.
- 14 DA SILVA, A. C. P.; VELASQUEZ, P. A. G. Perfil de resistência de *Klebsiella*
15 *pneumoniae* isoladas de pacientes da unidade de terapia intensiva de um hospital no
16 sudoeste do Paraná. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 18, n. 2, p. 259-270, 2018.
- 17 DARAEE, H. *et al.* Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial**
18 **cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 381-391, 2016.
- 19 DE CAMPOS, L. R. P. *et al.* Risk factors for bloodstream infection by multidrug-
20 resistant organisms in critically ill patients in a reference trauma hospital. **American**
21 **journal of infection control**, v. 50, n. 6, p. 673-679, 2022.
- 22 DE MORAES, L. S. *et al.* High mortality from carbapenem-resistant *Klebsiella*
23 *pneumoniae* bloodstream infection. **Microbial Pathogenesis**, v. 167, p. 105519,
24 2022.
- 25 DEL RIO, L. A. *et al.* Antibiotics from *Pseudomonas reptilivora* II. Isolation,
26 Purification, and Properties. **Antimicrob. Agents Chemother**, n. 2, p. 189–194, 1972.
- 27 DRULIS-KAWA, Z.; DOROTKIEWICZ-JACH, A. Liposomes as delivery systems for
28 antibiotics. **International journal of pharmaceutics**, v. 387, n. 1-2, p. 187-198,
29 2010.
- 30 EGAWA, Y. *et al.* Antibiotic YC 73 of *Pseudomonas* origin. I. Production, Isolation
31 and Properties. **J. Antibiot**, n. 23, p. 267–270, 1970.
- 32 ELERAKY, N. E. *et al.* Nanomedicine fight against antibacterial resistance: an
33 overview of the recent pharmaceutical innovations. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p.
34 142, 2020.
- 35 FAN, X. *et al.* S-thanatol functionalized liposome potentially targeting
36 on *Klebsiella pneumoniae* and its application in sepsis mouse model. **Frontiers in**
37 **Pharmacology**, v. 6, p. 249, 2015.
- 38 FREDIANI, A. V. *et al.* ESBL in positive hemoculture of a Southern-Brazil Teaching

- 1 Hospital's Intensive Care Units. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. 269571,
2 2023.
- 3 GIONCO, B. **Analysis of Differential Gene Expression of an Environmental**
4 **Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Producing an Organometallic Compound**
5 **Bioactive and their Activity Against Multidrug Resistant *Acinetobacter***
6 ***baumannii* Isolates**. 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade
7 Estadual de Londrina, Londrina, 2016.
- 8 GIONCO, B. *et al.* New Insights about Antibiotic Production by *Pseudomonas*
9 *aeruginosa*: A Gene Expression Analysis. **Front. Chem**, v. 5, n. 66, 2017.
- 10 GÓIS, C.G.M. *et al.* The Control of *Lactobacillus* sp. by Extracellular Compound
11 Produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the Fermentation Process of Fuel Ethanol
12 Industry in Brazil. **J. Sustain. Bioenergy Syst**, v. 3, p. 194–201, 2013.
- 13 GONZALEZ GOMEZ, A.; HOSSEINIDOUST, Z. Liposomes for antibiotic
14 encapsulation and delivery. **ACS infectious diseases**, v. 6, n. 5, p. 896-908, 2020.
- 15 GUBERNATOR, J. *et al.* *In vitro* antimicrobial activity of liposomes containing
16 ciprofloxacin, meropenem and gentamicin against gram-negative clinical bacterial
17 strains. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 4, n. 4, p. 297-304, 2007.
- 18 HEDMAN, R. *et al.* Use of a Known Substance for the Treatment of Cancer and
19 Bacterial and Fungal Infections. WO 2004050095A1. 2004. Disponível em:
20 <https://patents.google.com/patent/WO2004050095A1/en>. Acesso em: 3 set. 2024)
- 21 IMRAN, M. *et al.* Overcoming multidrug resistance of antibiotics via nanodelivery
22 systems. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 586, 2022.
- 23 ITOH, S.; INUZUKA, K.; SUZUKI, T. New Antibiotics Produced by Bacteria Grown on
24 n-paraffin (Mixture of C12, C13 and C14 Fractions). **J. Antibiot**, v. 23, p. 542–545,
25 1970.
- 26 JACOBS, D.M., *et al.* Triple Combination Antibiotic Therapy for Carbapenemase-
27 Producing *Klebsiella pneumoniae*: A Systematic Review. **Annals of Clinical**
28 **Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, p. 1–12, 2017.
- 29 JOSEPH, L. *et al.* From *Klebsiella pneumoniae* colonization to dissemination: an
30 overview of studies implementing murine models. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p.
31 1282, 2021.
- 32 KAKKAR, R.; DUA, A.; GAHLOT, P. Metal Ion Complexes of Thioformin: A Density
33 Functional Study. **Polyhedron**, v. 26, p. 5301–5308, 2007.
- 34 KARAMPATAKIS, T.; TSENGOULI, K.; BEHZADI, P. Carbapenem-resistant
35 *Klebsiella pneumoniae*: Virulence factors, molecular epidemiology and latest updates
36 in treatment options. **Antibiotics**, v. 12, n. 2, p. 234, 2023.
- 37 KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal**
38 **of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.

- 1 KERBAUY, G. *et al.* Effect of a Metalloantibiotic Produced by *Pseudomonas*
2 *aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K.*
3 *pneumoniae*. **Curr. Pharm. Biotechnol**, v. 17, p. 389–397, 2016.
- 4 KHAN, A. A. *et al.* Recent strategies towards the surface modification of liposomes:
5 an innovative approach for different clinical applications. **3 Biotech**, v. 10, n. 4, p. 1-
6 15, 2020.
- 7 KLOSS, C. P. *et al.* Occurrence of the bacteria in a hospital environment and their
8 sensitivity profile to the main antimicrobials in a reference general hospital in Curitiba,
9 Brazil. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 27, n. 5, p. 2642-2653,
10 2023.
- 11 KO, H.R. *et al.* Production, Isolation and Characterization of the Antibiotic from
12 *Pseudomonas aeruginosa* 3120. **Appl. Biol. Chem**, v. 36, p. 428–433, 1993.
- 13 KOCHAN, T. J. *et al.* Genomic surveillance for multidrug-resistant or hypervirulent
14 *Klebsiella pneumoniae* among United States bloodstream isolates. **BMC Infectious**
15 **Diseases**, v. 22, n. 1, p. 603, 2022.
- 16 KUMAR, S.; SHARMA, Y. Polymyxin-B: A Novel Approach for the Treatment of
17 Antibiotic-Resistant Infections—A Review. **PIJ Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 6, p.
18 65-86, 2023.
- 19 KUMAR, V. *et al.* Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A
20 comprehensive review. **Chemosphere**, v. 262, p. 127810, 2021.
- 21 LAN, P. *et al.* Emergence of high-level cefiderocol resistance in carbapenem-
22 resistant *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections in patients with
23 hematologic malignancies in China. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e00084-
24 22, 2022.
- 25 LAWS, M.; SHAABAN, A.; RAHMAN, K. M. Antibiotic resistance breakers: current
26 approaches and future directions. **FEMS microbiology reviews**, v. 43, n. 5, p. 490-
27 516, 2019.
- 28 LEONG, J.; BELL, S.J. Coordination Isomers of Antibiotic Thiohydroxamate-metal
29 Complexes. Geometrical Isomers of tris(N-methylthioformohydroxamato)rhodium(III)
30 and bis(N-methylthioformohydroxamato)platinum(II). **Inorg. Chem**, v. 17, p. 1886–
31 1892, 1978.
- 32 LESSA, F. C.; SIEVERT, D. M. Antibiotic resistance: A global problem and the need
33 to do more. **Clinical Infectious Diseases**, v. 77, n. Supplement_1, p. S1-S3, 2023.
- 34 LI, M. *et al.* Composition design and medical application of liposomes. **European**
35 **journal of medicinal chemistry**, v. 164, p. 640-653, 2019.
- 36 LIPWORTH, S. *et al.* Ten-year longitudinal molecular epidemiology study of
37 *Escherichia coli* and *Klebsiella* species bloodstream infections in Oxfordshire,
38 UK. **Genome medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2021.
- 39 LIU, P.; CHEN, G.; ZHANG, J. A review of liposomes as a drug delivery system:

- 1 current status of approved products, regulatory environments, and future
2 perspectives. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1372, 2022.
- 3 LOMBARDO, D.; KISELEV, M. A. Methods of liposomes preparation: Formation and
4 control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine
5 application. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, p. 543, 2022.
- 6 LOPES, L. P *et al.* Activity of Extracellular Compounds of *Pseudomonas* sp. against
7 *Xanthomonas axonopodis* *in vitro* and Bacterial Leaf Blight in Eucalyptus. **Trop.**
8 **Plant Pathol**, v. 37, p. 233–238, 2012.
- 9 MA, L. *et al.* Fluopsin C Induces Oncosis of Human Breast Adenocarcinoma Cells.
10 **Acta Pharmacol. Sin**, v. 34, p. 1093–1100, 2013.
- 11 MACHADO, L.C.; GNOATTO, S.A.; KLÜPPEL, M.L. Lipossomas aplicados em
12 farmacologia: uma revisão da literatura. **Estudos de Biologia**, v. 29, n. 67, 2007.
- 13 MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and
14 pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard
15 definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3,
16 p. 268-281, 2012.
- 17 MALHOTRA, N. *et al.* Review of copper and copper nanoparticle toxicity in
18 fish. **Nanomaterials**, v. 10, n. 6, p. 1126, 2020.
- 19 MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory
20 genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection**
21 **microbiology**, v. 8, p. 4, 2018.
- 22 MARTINEZ-MOLINA, E.; DEL RIO, L.A.; OLIVARES, J. Copper and Iron as
23 Determinant Factors of Antibiotic Production by *Pseudomonas reptilivora*. **J. Appl.**
24 **Bacteriol**, v. 41, p. 69–74, 1976.
- 25 MAZZOLI, R., RIEDEL, K., PESSIONE, E. Bioactive Compounds from Microbes.
26 **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 392, 2017.
- 27 MEKTRIRAT, R. *et al.* Utilizing liposomal encapsulation approach to address
28 nephrotoxic challenges of colistimethate sodium through a preclinical
29 study. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 2023.
- 30 MENG, H. *et al.* Risk factors and clinical outcomes of carbapenem-resistant
31 *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in children: a retrospective study. **International**
32 **Journal of Antimicrobial Agents**, 2023.
- 33 MIRANDA, I. F. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo
34 KPC: disseminação mundial e situação atual no Brasil. **Brazilian Journal of**
35 **Surgery and Clinical Research**, v. 25, n. 2, p.113-119, 2019.
- 36 MIYAMURA, S. *et al.* An Antitumor Antibiotic, no. 4601 from Streptomyces, Identical
37 with YC 73 of *Pseudomonas* origin. **J. Antibio.**, v. 25, p. 369–370, 1972.
- 38 MORGADO, S.; FONSECA, E.; VICENTE, A. C. Genomics of *Klebsiella pneumoniae*

- 1 species complex reveals the circulation of high-risk multidrug-resistant pandemic
2 clones in human, animal, and environmental sources. **Microorganisms**, v. 10, n. 11,
3 p. 2281, 2022.
- 4 MUNHOZ, L.D. *et al.* Control of Bacterial Stem Rot on Tomato by Extracellular
5 Bioactive Compounds Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Cogent**
6 **Food Agric**, 2017.
- 7 MUNOZ-PRICE, L. S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of
8 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n.
9 9, p. 785-796, 2013.
- 10 NAVARRO, M.O.P. *et al.* Determining the Targets of Fluopsin C Action on Gram-
11 negative and Gram-positive Bacteria. **Front. Microbiol**, v. 11, p. 1076, 2020.
- 12 NAVARRO, M.O.P. *et al.* Fluopsin C for Treating Multidrug-resistant Infections: *In*
13 *vitro* Activity against Clinically Important Strains and *in vivo* Efficacy Against
14 Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Front. Microbiol**, v. 10, p. 2431,
15 2019.
- 16 NSAIRAT, H. *et al.* Liposomes: Structure, composition, types, and clinical
17 applications. **Heliyon**, v. 8, n. 5, 2022.
- 18 O'BRIEN, H.; DAVOODIAN, T.; JOHNSON, M. D. L. The promise of copper
19 ionophores as antimicrobials. **Current Opinion in Microbiology**, v. 75, p. 102355,
20 2023.
- 21 OLIVEIRA, A.G. *et al.* Evaluation of the Antibiotic Activity of Extracellular Compounds
22 Produced by the *Pseudomonas* Strain Against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306
23 Strain. **Biol. Control**, v. 56, p. 125–131, 2011.
- 24 OLIVEIRA, A.G. *et al.* Bioactive Organocopper Compound from *Pseudomonas*
25 *aeruginosa* Inhibits the Growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Front. Microbiol**, v.
26 7, p. 113, 2016.
- 27 PANAHI, Y. *et al.* Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis,
28 characterization and biomedical applications. **Artificial cells, nanomedicine, and**
29 **biotechnology**, v. 45, n. 4, p. 788-799, 2017.
- 30 PANG, X. *et al.* Bacteria-responsive nanoliposomes as smart sonotheranostics for
31 multidrug resistant bacterial infections. **ACS nano**, v. 13, n. 2, p. 2427-2438, 2019.
- 32 PATTESON, J.B. *et al.* Biosynthesis of Fluopsin C, a Copper-containing Antibiotic
33 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Science**, v. 374, p. 1005–1009, 2021.
- 34 PIDDOCK, L. J. V. Reflecting on the final report of the O'Neill Review on
35 Antimicrobial Resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 767-768,
36 2016.
- 37 PINHEIRO, M.; MAGALHÃES, J.; REIS, S. Antibiotic interactions using liposomes as
38 model lipid membranes. **Chemistry and physics of lipids**, v. 222, p. 36-46, 2019.

- 1 PISTORI, J. F. *et al.* Low-molecular-weight Metabolites Produced by *Pseudomonas*
2 *aeruginosa* as an Alternative to Control Huanglongbing in *Citrus sinensis* cv.
3 Valencia. **Trop. Plant Pathol**, v. 43, p. 289–296, 2018.
- 4 QIN, X. *et al.* The Colonization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*:
5 Epidemiology, Resistance Mechanisms, and Risk Factors in Patients Admitted to
6 Intensive Care Units in China. **The Journal of infectious diseases**, v. 221, n.
7 Supplement_2, p. S206-S214, 2020.
- 8 RAFAILIDIS, Petros I.; KOFTERIDIS, Diamantis. Proposed amendments regarding
9 the definitions of multidrug-resistant and extensively drug-resistant bacteria. **Expert**
10 **review of anti-infective therapy**, v. 20, n. 2, p. 139-146, 2022.
- 11 RAMPAZO, L. G. L. **Evaluation of Biological Agents and their Products on the**
12 **Incidence of Citrus Canker Foliar Lesions**. Dissertação (Mestrado em
13 Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil, 2004.
- 14 RELLO, J. *et al.* Sepsis: a review of advances in management. **Advances in**
15 **Therapy**, v. 34, n. 11, p. 2393-2411, 2017.
- 16 REMICK, D. G. *et al.* Premise for standardized sepsis models. **Shock**, v. 51, n. 1, p.
17 4-9, 2019.
- 18 RIBEIRO, L. N. M. *et al.* Hybrid pectin-liposome formulation against multi-resistant
19 bacterial strains. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 769, 2020.
- 20 ROCHA, V. F. D. *et al.* Prolonged outbreak of carbapenem and colistin-resistant
21 *Klebsiella pneumoniae* at a large tertiary hospital in Brazil. **Frontiers in**
22 **Microbiology**, v. 13, 2022.
- 23 SACHETELLI, S. *et al.* Demonstration of a fusion mechanism between a fluid
24 bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. **Biochimica et Biophysica**
25 **Acta (BBA) Biomembranes**, v. 1463, n. 2, p. 254-266, 2000.
- 26 SAVOLDI, A. *et al.* Gross national income and antibiotic resistance in invasive
27 isolates: analysis of the top-ranked antibiotic-resistant bacteria on the 2017 WHO
28 priority list. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 12, p. 3619-3625,
29 2019.
- 30 SCHIFFELERS, R. M. *et al.* Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated
31 gentamicin in rat *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in relation to impaired host
32 defense and low bacterial susceptibility to gentamicin. **Antimicrobial agents and**
33 **chemotherapy**, v. 45, n. 2, p. 464-470, 2001.
- 34 SCRIBONI, A. B. *et al.* Fusogenic liposomes increase the antimicrobial activity of
35 vancomycin against *Staphylococcus aureus* biofilm. **Frontiers in Pharmacology**, v.
36 10, p. 1401, 2019.
- 37 SHARMA, D. Fluopsin C: a potential candidate against the deadly drug-resistant
38 microbial infections in humans. **Future Microbiol**, v. 15, p. 381-384, 2020.
- 39 SHARMA, A. *et al.* Indian priority pathogen list to guide research, discovery and

- 1 development of new antibiotics in India. **World Health Organization country office**
2 **for India**, 2021.
- 3 SHEU, C. C. *et al.* Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae:
4 An Update on Therapeutic Options. **Frontiers in microbiology**, v. 10, 2019.
- 5 SHIRAHATA, K. *et al.* The Structures of Fluopsins C and F. **J. Antibiot**, v. 23, p.
6 546–550, 1970.
- 7 SIMIONATO, A. S. *et al.* Whole-Genome Sequence of Bioactive Compound-
8 Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strain LV. **Microbiology Resource**
9 **Announcements**, v. 10, n. 1, 2021.
- 10 SILVA, A. R. O. *et al.* Geographical variation in antimicrobial use and multiresistant
11 pathogens in Brazilian intensive care units: a nationwide study. **The Journal of**
12 **Infection in Developing Countries**, v. 17, n. 04, p. 485-493, 2023.
- 13 SINGER, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic
14 shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.
- 15 SINGH, M. *et al.* Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. **3**
16 **Biotech**, v. 7, n. 5, p. 315, 2017.
- 17 SOLANKY, D. *et al.* Prescribing of outpatient antibiotics commonly used for
18 respiratory infections among adults before and during the coronavirus disease 2019
19 pandemic in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 77, n. Supplement_1, 2023.
- 20 SON, G.H.; LEE, B.J.; CHO, C.W. Mechanisms of drug release from advanced drug
21 formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid
22 nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 47, n. 4, p. 287-296,
23 2017.
- 24 SPOLADORI, L. F. A. *et al.* Synergistic Antifungal Interaction between *Pseudomonas*
25 *aeruginosa* LV Strain Metabolites and Biogenic Silver Nanoparticles against *Candida*
26 *auris*. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 861, 2023.
- 27 TAYLOR, A. A. *et al.* Critical review of exposure and effects: implications for setting
28 regulatory health criteria for ingested copper. **Environmental management**, v. 65, p.
29 131-159, 2020.
- 30 UZAIKUE, L. I. *et al.* Global prevalence of colistin resistance in *Klebsiella*
31 *pneumoniae* from bloodstream infection: A systematic review and meta-
32 analysis. **Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1092, 2022.
- 33 VASCONCELLOS, F.C.S. *et al.* Evaluation of Antibiotic Activity Produced by
34 *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain Against *Xanthomonas arboricola* pv. pruni.
35 **Agric. Sci**, v. 5, p. 71–76, 2014.
- 36 WANG, D. Y. *et al.* Lipid-based antimicrobial delivery-systems for the treatment of
37 bacterial infections. **Frontiers in chemistry**, v. 7, p. 872, 2020.
- 38 WANG, Y.; GRAINGER, D. W. Lyophilized liposome-based parenteral drug

- 1 development: Reviewing complex product design strategies and current regulatory
2 environments. **Advanced drug delivery reviews**, v. 151, p. 56-71, 2019.
- 3 WANG, Z. *et al.* Fusion between fluid liposomes and intact bacteria: study of driving
4 parameters and *in vitro* bactericidal efficacy. **International journal of**
5 **nanomedicine**, v. 11, p. 4025, 2016.
- 6 WATERS, J. E. *et al.* Recent advances in the development of metal complexes as
7 antibacterial agents with metal-specific modes of action. **Current Opinion in**
8 **Microbiology**, v. 75, 2023.
- 9 WEAVER, E. *et al.* Liposomal encapsulation of amoxicillin via microfluidics with
10 subsequent investigation of the significance of PEGylated therapeutics. **International**
11 **Journal of Pharmaceutics**, v. 650, p. 123710, 2024.
- 12 WERNER, J. *et al.* Improved pharmacokinetics and enhanced efficacy of the
13 vancomycin derivative FU002 using a liposomal nanocarrier. **Nanomedicine:**
14 **Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 56, p. 102731, 2024.
- 15 WINK P. L. *et al.* Increased frequency of *bla*NDM in a tertiary care hospital in
16 southern Brazil. **Brazilian J Microbiol.**, v. 52, n. 1, p. 299–301, 2021.
- 17 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global antimicrobial resistance and**
18 **use surveillance system (GLASS) report: 2021**. 2021.
- 19 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global antimicrobial resistance and**
20 **use surveillance system (GLASS) report: 2022**. 2022.
- 21 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global priority list of antibiotic-**
22 **resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new**
23 **antibiotics**. 2017.
- 24 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Bacterial Priority Pathogens**
25 **List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research,**
26 **development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**.
27 Geneva: World Health Organization; 2024.
- 28 WRIGHT, G. D. Opportunities for natural products in 21 st century antibiotic
29 discovery. **Natural product reports**, v. 34, n. 7, p. 694-701, 2017.
- 30 YANG, Shuibing *et al.* Preparation and characterization of nanoliposomes entrapping
31 medium-chain fatty acids and vitamin C by lyophilization. **International journal of**
32 **molecular sciences**, v. 14, n. 10, p. 19763-19773, 2013.
- 33 ZUCKER, Daniel *et al.* Liposome drugs' loading efficiency: a working model based on
34 loading conditions and drug's physicochemical properties. **Journal of controlled**
35 **release**, v. 139, n. 1, p. 73-80, 2009.

36

37

38

1 **4 ARTIGO ***

2 * Os tópicos de material e métodos, resultados e discussão foram redigidos em
3 formato de artigo com finalidade representativa de comprovação da relação aluno-
4 orientador durante a Tese de Doutorado em Microbiologia. Portanto, esta versão não
5 corresponde ao artigo em sua versão publicada.
6

7 **Liposomal Fluopsin C: physicochemical properties,**
8 **cytotoxicity, and antibacterial activity *in vitro* and over**
9 ***in vivo* MDR *Klebsiella pneumoniae* bacteremia model**

10 Mickely Liuti Dealis Gomes; Luís Fernando Cabeça; Galdino Andrade*

11 **Abstract:** Antimicrobial resistance has become a global concern and few new
12 antimicrobials are currently developing. Fluopsin C has proven broad-spectrum
13 activity, being a promising candidate for new antimicrobial development. To optimize
14 antimicrobial activity, this research aimed at Fluopsin C (Flp) encapsulation in
15 liposomes to achieve controlled release and reduce cytotoxicity. Liposomal formulations
16 were prepared by extruding formulations based on soy phosphatidylcholine (SPC) or
17 poly(ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE-PEG) plus
18 cholesterol; and were characterized by their size, polydispersity index, zeta potential,
19 encapsulation efficiency, shelf-life stability, *in vitro* release profile, cytotoxicity, and
20 antimicrobial activity against *Klebsiella pneumoniae in vitro* and *in vivo*. The results
21 indicated that the DSPE-PEG DMSO+Flp formulation presented superior
22 physicochemical stability and unaltered antimicrobial activity. *In vitro*, CC_{50} decreased
23 by 54%. No lethal dose was obtained in mice within the concentration range tested. The
24 most effective doses *in vivo* were 2×2 mg/kg for free Fluopsin C and 1×2 mg/kg for
25 DSPE-PEG DMSO+Flp, resulting in a 40% reduction in mortality from bacteremia. Only
26 discrete inflammatory infiltration was detected in the liver, while kidney necrosis
27 ranged from discrete to moderate. Encapsulation of Fluopsin C in liposomes showed
28 promising features supporting to use against infections by MDR *K. pneumoniae*.

29 **Keywords:** Natural product; antimicrobial; toxicity; liposomes; *Pseudomonas*
30 *aeruginosa* LV; encapsulation.
31

32 **1. Introduction**

33 Among infections caused by multidrug-resistant (MDR)
34 microorganisms, the World Health Organization (WHO) classified
35 carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE), including *Klebsiella*
36 *pneumoniae*, as critical in terms of the urgency for developing new
37 antibiotics [1-2]. *K. pneumoniae* is particularly associated with severe
38 bloodstream infections and secondary pneumonia in patients with viral
39 respiratory infections [3].

40 The search for new MDR-suppressing antimicrobials includes
41 overcoming current approaches such as combinatory therapies and
42 dosage augmentation, usage reformulations of already commercialized
43 drugs and developing new drugs with novel modes of action [4-8].
44 Fluopsin C (Flp), a natural broad-spectrum antimicrobial discovered five
45 decades ago, produced by the secondary metabolism of *Pseudomonas* spp.

1 and *Streptomyces* sp. grown in the presence of copper, shows efficiency
2 against MDR strains, *in vitro* and *in vivo* [9-12]. In addition, a low
3 frequency of Fluopsin C-resistant mutants was observed, as well as an
4 efficient antibiofilm activity [9-11]. However, the application of
5 compound was discouraged due to a high toxicity found in *in vitro* and *in*
6 *vivo* experiments, still considered unviable for clinical purposes [10- 14],
7 in addition to the poor pharmacokinetic properties [10].

8 Several antimicrobials exhibit low or moderate cytotoxicity and
9 remain essential resources to fight MDR infections [14]. In this context, we
10 believe that developing formulations for Fluopsin C may be a key to
11 enhancing the potential as a new drug development. Liposomal
12 encapsulation is a promising strategy to reduce the compound toxicity.
13 This system controlled drug release that is widely explored in
14 pharmacology, improving treatments for high-risk pathogens while
15 minimizing adverse effects found in conventional formulations [15-16].
16 This method show some advantages include enhancing the therapeutic
17 effects controlling drug release, reducing toxicity, enhancing
18 pharmacokinetics and solubility, and reducing doses required to maintain
19 the therapeutical effect [15, 17-19].

20 In the present study, Fluopsin C was enveloped with liposomes to
21 reduce the compound cytotoxicity, enhance the pharmacokinetic
22 properties, and assess the antimicrobial activity against clinical isolates of
23 *K. pneumoniae* *in vitro* and *in vivo*. This approach aimed to establish new
24 options for Fluopsin C use, increased Flp properties to develop a new
25 antimicrobial targeting MDR *K. pneumoniae*.
26

27 2. Results

28 2.1. Characterization of the Fluopsin C-containing liposomal formulations

29 Four liposomal formulations were developed for comparison of their
30 physicochemical features. All formulations followed the ratio of total
31 lipids: Fluopsin C (Flp) at 1:1 Mm and are based on soy
32 phosphatidylcholine (SPC), distearoyl phosphatidyl ethanolamine -
33 polyethyleneglycol (DSPE-PEG) and cholesterol in different
34 concentrations that have been proven over time.
35

36 Data obtained from the initial physical-chemical characterization of
37 liposomes containing Fluopsin C (Figure 1) showed that at time zero, all
38 formulations presented a Polydispersity Index (PDI) below 0.3. Regarding
39 the liposomal hydrodynamic diameter, DSPE-PEG-containing
40 formulations were smaller than those containing only SPC. Membrane
41 charges measured by zeta potential (ZP) were higher in formulations with
42 dimethylsulfoxide (DMSO), than in those without this Fluopsin C solvent,
43 specifically SPC DMSO+Flp and DSPE-PEG DMSO+Flp, which were
44 negatively charged.

45 The stability of the formulations was assessed at specific time zero
46 (up to 30 days after production), 3, 6, and 12 months after production.
47 DSPE-PEG formulations presented smaller diameters in the long term,
48 especially when stored in solutions. Overall, ZP charges tended decreases
49 over time; after 12 months, all formulations showed ZP values above -10
50 mV. Regarding the PDI, all formulations in all storage conditions did not
51 exceed the value of 0.3, considered a good stability parameter for large-
52 scale production.

The Fluopsin C-containing liposomal formulations and their respective liposomal controls, were analyzed through Scanning Electron Microscopy (SEM) in time zero revealing a high degree of deformity in the control formulations (*i.e.* without incorporation of Fluopsin C). In contrast, Fluopsin C-containing liposomes displayed a spherical shape with morphological uniformity, consistent with the results determined by Dynamic light scattering (DLS).

The incorporation of Fluopsin C in formulations DMSO-containing enhanced the best encapsulation efficiency (Table 1), around 80%.

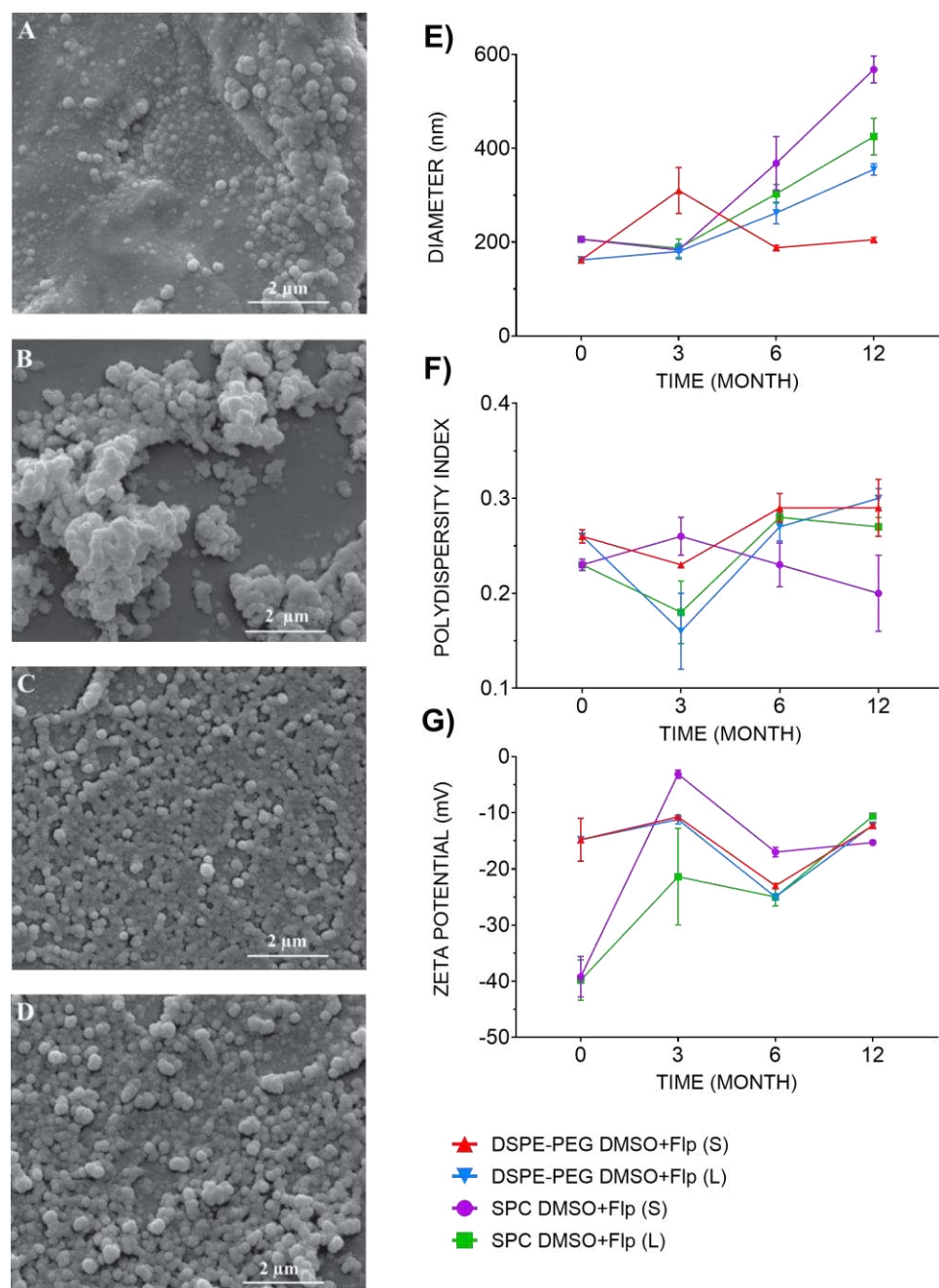


Figure 1. Formulation morphology and their respective controls were analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) under 30.000 X magnification in time zero. **A)** DSPE-PEG DMSO; **B)** SPC DMSO; **C)** DSPE-PEG DMSO+F1p; and **D)** SPC DMSO+F1p. Physical-chemical characterization of Fluopsin C-containing

liposomal formulations. **E)** Hydrodynamic diameter (nm), **F)** Polydispersity Index (PDI), and **G)** zeta potential (ZP, mV) were obtained by NanoPlus particle analyzer right after production and after 0, 3, 6, and 12 months. Formulations were stored in the form of solution (S), and lyophilized (L).

Table 1. Encapsulation efficiency (EE, %) for the different Fluopsin C-containing liposomal formulations.

Formulations	EE (%)
SPC+Flp	66.04 ± 8.19
SPC DMSO+Flp	83.75 ± 1.95
DSPE-PEG+Flp	78.04 ± 3.58
DSPE-PEG DMSO+Flp	83.67 ± 2.06

Fluopsin C release kinetics *in vitro* was monitored for the free compound, and the DMSO-containing formulations (SPC DMSO+Flp and DSPE-PEG DMSO+Flp) (Figure 2). After 11 h, 87% of free Fluopsin C was released. In the liposomal formulations, at the same time, the value reached 63% for SPC DMSO+Flp and 52% for DSPE-PEG DMSO+Flp of the available 1 mM. Considering the EE in the release of liposomal Fluopsin C, there was a gradual release of encapsulated material over the first 11 h, $11.88 \pm 1.69 \mu\text{g/h}$ for SPC DMSO+Flp, $9.81 \pm 1.88 \mu\text{g/h}$ for DSPE-PEG DMSO+Flp compared to $19.32 \pm 2.44 \mu\text{g/h}$ for free Fluopsin C.

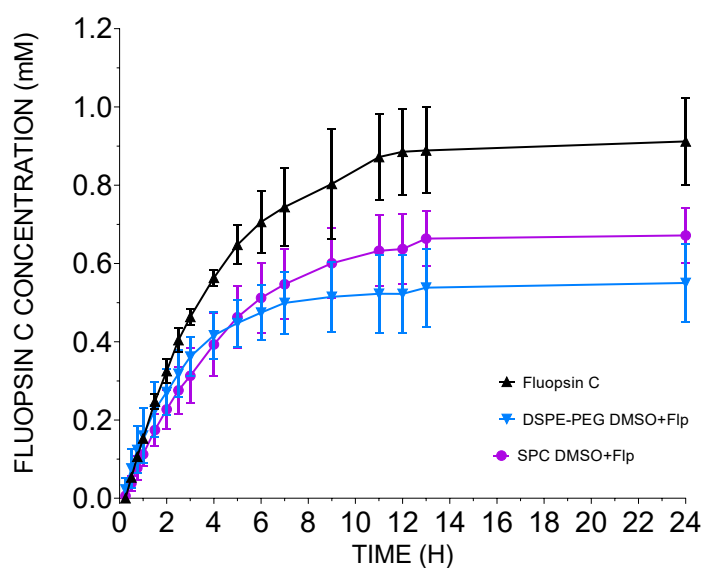


Figure 2. *In vitro* release curve of free and liposomal Fluopsin C formulations using Franz cells, over 24 h.

2.2 Determination of *in vitro* liposomal Fluopsin C cytotoxicity

Cytotoxicity in LLC-MK2 cells was assessed for free Fluopsin C, the liposomal formulations SPC DMSO+Flp and DSPE-PEG DMSO+Flp, and their respective control (Table 2). Compared to the free Fluopsin C, DSPE-PEG DMSO+Flp reduced the cytotoxicity 54% and 48% in the CC_{50} and CC_{90} values, respectively. Meanwhile, SPC DMSO+Flp reduction observed were 69% and 88% in CC_{50} and CC_{90} , respectively. The DSPE-PEG DMSO liposomal control did not affect cell viability, even at the highest concentration tested, with 100% of the cells viable.

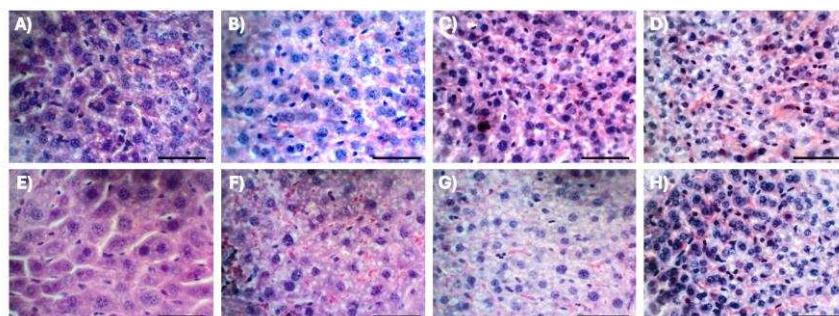
Table 2. *In vitro* cytotoxic concentrations of free and liposomal Fluopsin C for 50% (CC₅₀) and 90% (CC₉₀) of the LLC-MK2 cell population by MTT test after 24 h of incubation.

Formulation	CC ₅₀ (µg/mL)	CC ₉₀ (µg/mL)
DSPE-PEG DMSO+Flp	1.14	1.26
DSPE-PEG DMSO	> 32.00	> 32.00
SPC DMSO+Flp	1.26	1.60
SPC DMSO	22.62	79.07
Fluopsin C	0.74	0.85

2.3 *In vivo* assessment of liposomal Fluopsin C toxicity

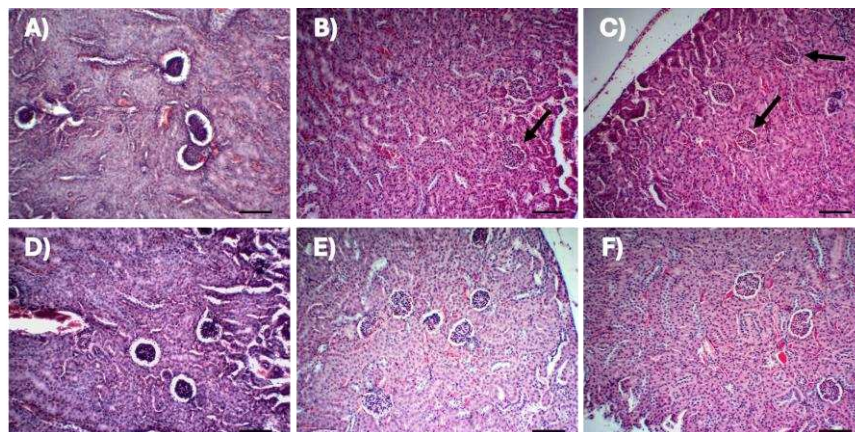
No mortality of Swiss mice was observed in the all concentration tested, therefore the lethal dose of DSPE-PEG DMSO+Flp was estimated as >8 mg/kg. Histopathological analyses were performed for assessment of acute toxicity (single dose, $n = 12$) and repeated doses toxicity (3 doses every 8 h, $n = 12$), in healthy animals using the most effective dose of 1×2 mg/kg DSPE-PEG DMSO+Flp intravenous [20]. Histopathological analysis of the liver revealed no hemorrhage in any time analyzed. However, mild to moderate necrosis and inflammatory infiltrate were present in all groups, including negative and liposomal controls (Appendix Table A1). The only significant difference in acute toxicity class occurred for hepatocytes' nuclei area ($p = 0.04$), though similar values were found in the control group. Treatments did not alter single-nucleus hepatocyte number. In terms of repeated doses toxicity, there are significant differences in 40 days in the number of double-nuclei hepatocytes, increasing along the tested time. In the same way, this fact occurred over time and were found in all treatments, except negative control, which maintained similar means throughout the study. suggesting that the liver may recover following the antimicrobial treatment (Figure 3).

Nephrotoxicity analysis revealed the presence of mild to moderate necrosis, without inflammatory infiltration or hemorrhage in all time of treatments (Appendix Table A1). Significant differences were found when comparing Bowman's space area on day one between the acute toxicity ($p = 0.002$) and repeated doses toxicity groups ($p = 0.003$), with the negative control. This indicates that, on the administration day, the Bowman's space area in the treated groups was contracted, while in the control a space area was found two time bigger. After the time zero, no significative differences were observed, indicating the recovery of the organ to a normal metrics (Figure 4). Additionally, proximal and distal tubules diameter remained unaltered, with consistent peripheral nucleus placement across all groups and time points.



1
2
3
4
5

Figure 3. Liver analysis of repeated doses toxicity (RDT) and negative control (NC) over 40 days post-treatment, in number of double-nuclei hepatocytes. **A)** NC in day one; **B)** NC in 10 days; **C)** NC in 20 days; **D)** NC in 40 days, **E)** RDT in day one; **F)** RDT in 10 days; **G)** RDT in 20 days; **H)** RDT in 40 days. Color: hematoxylin/eosin (HE). Scale bar: 50 μ m.



6

7
8
9
10
11
12

Figure 4. Nephrotoxicity analysis in Bowman's space area on day one and after 10 days post-treatment. Black arrows indicate that Bowman's space areas in the treated groups were contracted on day one. **A)** Negative control on day one, **B)** repeated doses toxicity group on day one, **C)** acute toxicity group on day one, **D)** negative control after 10 days **E)** acute toxicity group after 10 days, **F)** repeated doses toxicity group after 10 days. Color: HE. Scale bar: 100 μ m.

13
14
15
16
17
18
19
20

2.4 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of Free and Liposomal Fluopsin C

Fluopsin C showed antibacterial activity against the *K. pneumoniae* strains tested. MIC and MBC values showed no significant difference for both strains, when compared Fluopsin C and Fluopsin C combined with liposome. For *K. pneumoniae* ATCC 10031 [10], the sensitive strain, the MIC and MBC values were both equal to 1.66 μ g/mL, while for *K. pneumoniae* KPN-19, MDR strain, they were both 3.32 μ g/mL.

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

2.5 Assessment of the effect of free and liposomal Fluopsin C over the bacteremia model in mice

Lethal bacterial inoculum for 100% of the animals using *K. pneumoniae* KPN-19 was achieved with 10^8 UFC/mL, 20 h after infection. Bacteremia was detected from the first blood collection (25 CFU/50 μ L blood). Post-mortem organs (lungs, kidneys and liver) assessment also indicated the generalized presence of the bacteria. This inoculum cell density was standardized for all further experiments.

The dose of 2×2 mg/kg of free Fluopsin C (Figure 5) led to a 20% mortality decrease after 24 h, compared to the other doses. The DSPE-PEG DMSO+Flp formulation provided the best outcome at 1×2 mg/kg, reducing mortality by 40% in the bacteremia in mice. Both were considered the most effective doses for free and encapsulated forms.

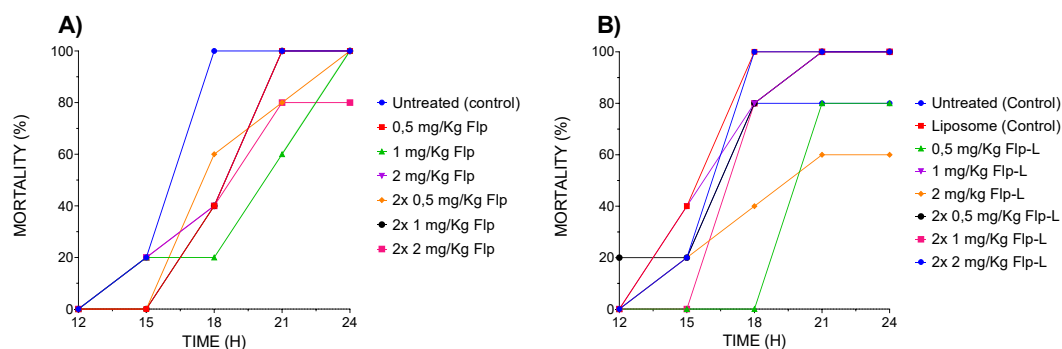


Figure 5. Mortality curve in mouse bacteremia model caused by *K. pneumoniae* KPN-19 treated, by intravenous, with different doses of **A)** Fluopsin C (Flp) and **B)** Liposomal Fluopsin C (Flp-L) DSPE-PEG DMSO+Flp formulation.

3. Discussion

Liposomal encapsulation to optimize antimicrobial performance is one of the most promising approaches currently available [15], being particularly beneficial to avoid antimicrobial resistance [21-22]. Fluopsin C showed promise broad-spectrum antimicrobial activity; however, the pharmacokinetics is low understanding, and high toxicity is a challenge during drug development, still considered unviable for clinical purposes [9-14]. Liposomal encapsulation should minimize the high cytotoxicity effects observed of Fluopsin C.

In the present study, the DSPE-PEG DMSO+Flp formulation showed the best physical-chemical properties from production to 12 months of storage, especially when stored in solution at low temperature. The formulation preserved the characteristics over time, with predicted variations in size and ZP, but not surpassing the desirable limits to use as an antimicrobial (< 500 nm, $> \pm 10$ mV, and ≤ 0.3 of PDI) [23]. A PDI value below 0.3 indicates monodispersity, and the homogeneity of size was confirmed using SEM [24].

After 11 h, the release of liposomal Fluopsin C (DSPE-PEG DMSO+Flp) reached 52%. Similar results were reported, and higher cholesterol content resulted in slower drug release over time, extending the duration of vancomycin and rifampicin release [25]. Cholesterol enhances vesicle stability and reduces membrane permeability, helping minimize cold-induced damage during lyophilization [26-27]. These results are in accordance with the finding of Scriboni et al. [28] that reported values of 30-70% of vancomycin release in 10 h, depending of the formulation tested, that was a similar method used in this paper.

In *in vivo* system, higher difference of release was expected among liposomal formulations, due to the presence of plasmatic proteins, increasing the potential of the DSPE-PEG DMSO+Flp formulation. In the absence of PEG of liposomal formulation, plasmatic proteins opsonize the liposomes, leading to clearance by the mononuclear phagocytic system [27, 29]. Previous studies on antimicrobial liposome encapsulation have found similar results like us, including encapsulation efficiency [30-33].

The SPC DMSO+Flp formulation with high concentration of Fluopsin C, presented CC_{50} and CC_{90} values 69% and 88% higher than free Fluopsin C. However, by other authors, this formulation could lead to fast

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
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

1 opsonization, phagocytosis, and removal from circulation by the action of
2 the mononuclear phagocyte system, presenting a potential risk for this
3 formulation [29]. DSPE-PEG DMSO+Flp was identified as the most
4 promising formulation due to the advantages over the immune system,
5 besides achieving CC₅₀ and CC₉₀ values 54% and 48% higher than free
6 Fluopsin C, respectively. These advantages were also observed by other
7 Authors [17]. In *in vivo*, there was no mortality associated with the use of
8 this formulation at 8 mg/kg, whereas free Fluopsin C showed a DL₅₀ of 4
9 mg/kg in mice [10].

10 Liver toxicity was detected as a mild inflammatory infiltrate, that also
11 was found by Navarro et al. [10]. However, complete recovery of the
12 organ was observed 40 days after administration of liposomal Fluopsin C
13 (Appendix Table A1). The nephrotoxicity profile differed from the one
14 found for free Fluopsin C [10], with the presence of necrosis (including in
15 the liposomal control), but without other types of lesions.

16 No alterations in antimicrobial activity were detected between free
17 and liposomal Fluopsin C *in vitro*, indicating that the encapsulation
18 technique did not suppress this activity. Our findings are similar to
19 Kerbauy et al. [11] with 1.95 µg/mL for ATCC 10031 and Navarro et al.
20 [10], with 1 µg/mL for ATCC 10031 and 2 µg/mL for KPN-19. In previous
21 studies by our group, treatment of mice infected with MDR *K. pneumoniae*
22 using 2 mg/kg of free Fluopsin C improved survival by 20% at 96 h [10].
23 Here, under similar infection conditions, we obtained a 40% reduction in
24 mortality for the same dose at 24 h.

25 4. Materials and Methods

26 4.1 Microorganisms

27
28 In this study, the target microorganism used was the human
29 pathogen *K. pneumoniae* ATCC 10031 strain as control, and KPN-19,
30 isolated from tracheal secretion. Both strains were provided by the
31 Laboratory of Basic and Applied Bacteriology of the State University of
32 Londrina that were used in a previous study [10, 11]. KPN-19 strain carries
33 the *bla_{KPC}* gene, presents porin loss, and resistance of many antibiotics
34 such as imipenem, meropenem, ertapenem, polymyxin B, and colistin
35 [11]. Fluopsin C-producing *Pseudomonas aeruginosa* LV strain (GenBank
36 CP058323.1) was isolated from citrus canker lesions of orange leaves in an
37 orchard at Astorga, Paraná, Brazil [34-35]. All strains were cryopreserved
38 in 40% (v/v) glycerol solution in liquid nitrogen and deposited in the
39 Laboratory of Microbial Ecology bank of microorganisms.
40

41 4.2 Production and Purification of Fluopsin C

42
43 *P. aeruginosa* LV was activated through two consecutive cultures of
44 48 and 24 h in nutrient agar plus 100 mg/L of CuCl₂·2H₂O, incubated at 28
45 °C. The Fluopsin C production process was performed according to the
46 patented procedure PI 0803350-1 [36], with the modifications proposed by
47 Afonso et al. and Bedoya et al. [9, 37]. Purification of Fluopsin C was
48 conducted using chromatographic processes, as described by Navarro et
49 al. [10]. The High-Performance Liquid Chromatography analysis
50 employed an Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies) equipped with
51 a Multi-Wavelength Detector and a Zorbax SB-C18 column (4.6 × 250 mm,
52 5 µm), as described by Bedoya et al. [37]. The purity level of Fluopsin C
used was higher than 80%.

4.3 Production and Extrusion of lipid vesicles

Four liposomal formulations were used to compare the physicochemical features (Table 3). All formulations followed the amount of total lipids as follows: Fluopsin C (Flp) 1:1 mM and are based on soy phosphatidylcholine (SPC), poly(ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE-PEG), and cholesterol in different concentrations. Liposomal formulations without Fluopsin C were used as control (*i.e.*, liposomal control) (named DSPE-PEG DMSO, DSPE-PEG, SPC DMSO, and SPC).

For each formulation, the respective lipids were aliquoted from chloroform stock solutions according to the concentrations described in Table 1. The samples were left at room temperature for chloroform evaporation, forming a lipid film. DSPE-PEG DMSO+Flp and SPC DMSO+Flp formulations plus Fluopsin C initially was diluted in DMSO 10% and was added in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), suspending the emulsion and promoting the incorporation of Fluopsin C. The other formulations (DSPE-PEG+Flp and SPC+Flp) had active incorporation of Fluopsin C, added during the formation process of the lipid film, after that, phosphate buffer was added to generate liposomal vesicles without DMSO addition.

After resuspended, the formulations were homogenized using a vortex (XH-D Vortex, Global Trade Technology, BR) for 1 minute (min) and sonicated (Ultrasonic Washer L200, Schuster, BR) for 1 min, forming large multilamellar liposomal vesicles. To obtain smaller liposomes, extrusion was performed using a Mini Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA) with polycarbonate membranes (0.4 μ m, 19 mm) (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabama, USA), for 15 cycles at room temperature.

Table 3. Composition of Fluopsin C-containing liposomal formulations.

Formulation	SPC ¹ (mM)	Cholesterol (mM)	DSPE- PEG ² (mM)	Fluopsin C (mM)	Phosphate buffer: DMSO ³ (%)
DSPE-PEG+Flp	0.54	0.41	0.05	1	100:0
DSPE-PEG DMSO+Flp	0.54	0.41	0.05	1	90:10
SPC+Flp	0.7	0.3	-	1	100:0
SPC DMSO+Flp	0.7	0.3	-	1	90:10

¹Soy phosphatidylcholine (SPC); ²Polyethylene glycol 2000 (PEG) conjugated to distearoyl phosphatidyl ethanolamine (DSPE); ³Dimethylsulfoxide (DMSO).

4.4 Characterization of Fluopsin C-containing Liposomes

Fluopsin C-containing liposome formulations were characterized by determination of zeta potential (ZP), polydispersity index (PDI), hydrodynamic diameter, encapsulation efficiency, and Fluopsin C release curve. The dynamic light scattering (DLS) was used to determine the mean liposome diameter, PDI, and ZP using a NanoPlus particle analyzer (Micromeritics Instrument Corporation, Georgia, USA). PDI below 0.3 was considered monodisperse [24]. Analysis of ZP, PDI, and liposomal diameter was performed in four times 0, 3, 6, and 12 months of storage at 10 °C. Liposomes were stored in solution and lyophilized. All measurements were performed in triplicate.

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
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

4.4.1 Encapsulation Efficiency

To determine encapsulation efficiency, the liposomal formulations were centrifuged in a Minispin (Eppendorf F45-12-11 rotor, Merck, Darmstadt, GER), at $12.100 \times g$ (G-Force) for 1 h. The Amicon Ultra-0.5 mL centrifugal filter unit (Ultracel-10 regenerated cellulose membrane, 10.000 NMWL, Merck, Darmstadt, GER) was used for liposome retention. The measurement of free Fluopsin C in solution (non-encapsulated) was performed by spectrophotometry [38] (BioMate3, Thermo, Massachusetts, USA) at $\lambda = 264$ nm. The absorbance were compared with a Fluopsin C calibration curve, for formulations in presence or absence of DMSO ($r^2 = 0,99$). The encapsulation efficiency (EE%) was determined by Equation 1 [25] and total Fluopsin C was set as 1 mM and free Fluopsin C in the solution was the amount retained in solution after liposomes removal by ultracentrifugation.

$$EE\% = \left(\frac{[Total\ Fluopsin\ C - free\ Fluopsin\ C]}{Total\ Fluopsin\ C} \right) \times 100$$

(Equation 1)

4.4.2 Determination of Free and Liposomal Fluopsin C Release Curve

Free and liposomal Fluopsin C released were determined to select the best formulation. Franz cells filled with phosphate plus 10% DMSO v/v in constant agitation were maintained at $37^\circ C$, ensuring sink condition [27]. Fluopsin C release was analyzed by spectrophotometry (BioMate3, Thermo, Massachusetts, USA) at $\lambda = 264$ nm. Aliquots of $300 \mu L$ were taken from the Franz cells at 15 and 30 min, 1, 2, 4, 6, 12, and 24 h. The absorbance was used to determine Fluopsin C concentration. The experiments were performed in triplicate.

4.5. Analysis of liposomal formulations by Scanning Electron Microscopy (SEM)

Samples of lyophilized liposomal formulations were fixed in glutaraldehyde 2.5% fixing solution for 30 min. After that, samples were washed three times with sodium cacodylate buffer 0.1 M pH 7.2, supplemented with paraformaldehyde solution 2%.

After washing, osmium tetroxide 1% was added, and the samples were incubated for 30 min in the dark to keep lipid conservation. After that, the samples were washed as described above. For dehydration, samples were treated with serial immersions in different concentrations of ethanol (70%, 90%, and 100%) for 10 min. The last concentration was repeated twice. After that, samples were dried at the critical point using CO_2 on a Critical Point Dryer 030 (BalTec Ag, Switzerland), coated with gold using the SDC 050 Sputter Coater (BalTec Ag, Switzerland), and was observed at FEI quanta 200 scanning electron microscope (FEI Company/Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA) operating at 30 kV.

4.6 Determination of *in vitro* Liposomal Fluopsin C Cytotoxicity

Likewise performed by Navarro et al. [10] and Kerbauy et al. [11], the LLC-MK2 cell line was grown in a 96-well plate in RPMI medium supplemented with fetal bovine serum 10%, with 2.5×10^4 cells/well and

1 incubated for 24 h at 37.0 °C CO₂ 5.0% [10-11, 39]. A 100% confluence, non-
2 adherent cells in suspension were removed by washing with sterile
3 phosphate-buffered saline (PBS, 0.1 M, pH 7.2).

4 Formulation DSPE-PEG DMSO+Flp, SPC DMSO+Flp, and the
5 respective control were serially diluted in RPMI medium, on
6 concentrations ranging from 32 to 0.25 µg/mL, and subsequently added
7 to the cell-containing wells. The treatments were incubated for 24 h under
8 the same conditions mentioned earlier. Cell viability was determined by
9 the MTT test (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium
10 bromide) (Sigma Chemical Co., Missouri, EUA) reduction method,
11 according to the manufacturer's recommendation. A non-linear
12 regression method was performed to determine the cytotoxic
13 concentration that inhibits 50% (CC₅₀) and 90% (CC₉₀) of the metabolic
14 activity of cell population in 24 h.
15

16 *4.7 Determination of the Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentration* 17 *of Free and Liposomal Fluopsin C*

18 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal
19 concentration (MBC) were determined for DSPE-PEG DMSO+Flp and
20 SPC DMSO+Flp formulations against *K. pneumoniae* ATCC 10031 and
21 KPN-19 strains. Tested concentrations ranged from 13.3 to 0.2 µg/mL,
22 including for free Fluopsin C. Controls consisted of the respective
23 formulations without the incorporation of Fluopsin C. The MIC values
24 were determined through the broth microdilution method following the
25 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [40], and
26 incubated for 24 h at 37 °C. For MBC determination, 10 µL aliquots from
27 each well of the microdilution method were plated onto Mueller-Hinton
28 Agar and incubated for 24 h at 37 °C.
29

30 *4.8 In vivo assessments*

31 32 4.8.1 Animals

33 The following experiments utilized 42-day-old female Swiss mice,
34 with an average weight of 25 g (total *n* = 189). These animals were
35 provided by the Central Bioterium of the Biological Sciences Center at the
36 State University of Londrina and the Central Bioterium of the State
37 University of Maringá. Ethical approval for animal use was granted by
38 the respective ethical commissions of the respective universities under the
39 registrations CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) n° 039.2021 and
40 CEUA n° 9838190121, respectively. The sample size was designed
41 according to Navarro et al. [10] for all experiments, intending to minimize
42 the use of animals.

43 Compliance with regulations concerning animal welfare and
44 management was ensured throughout the study. The animals were
45 randomly distributed for the adaptation period in the new environment,
46 before each experiment. To minimize confounding factors, the cages were
47 kept in ascending order according to the corresponding dose, and the
48 control groups were segregated on another shelf, with greater spacing
49 from the others, avoiding cross-contamination. For the same purpose, the
50 animals were identified with a number according to the cage number, in
51 a painless way.
52

4.8.2 Lethal inoculum of *K. pneumoniae* Kpn-19 and bacteremia model establishment

For the determination of the lethal inoculum, $n = 5$ animals were infected intraperitoneally with *K. pneumoniae* KPN-19 (0.5 mL) at different cell densities of 10^7 , 10^8 , and 10^9 CFU/mL. The control group ($n = 5$) was administered with sterilized saline solution. The animals were observed until 96 h post-inoculation. Totalizing, $n = 20$ animals.

After the previous results, the bacteremia model was confirmed by infecting $n = 5$ animals with 10^8 CFU/mL, intraperitoneally. 50 μ L of caudal blood was collected post-anesthesia every 2 h after inoculation. Time zero was defined as 10 min after inoculation. The blood samples were plated on blood agar and incubated at 37.0 °C for 24 h. After euthanasia, the lungs, kidneys, and liver were collected. The organs were weighed and macerated, and the product was serially diluted in sterilized PBS. Aliquots were then plated on blood agar and incubated at 37.0 °C for 24 h. The same procedures were performed for control group animals ($n = 5$). Totalizing, $n = 10$ animals.

4.8.3 Lethal dose for Fluopsin C liposomal formulation

Liposomal Fluopsin C lethal dose (LD) was determined by intravenous administration according to Navarro et al. [10]. Single applications of DSPE-PEG DMSO+Flp formulation (0.1 mL) were administered at different doses of 0.5, 1, 2, 4, and 8 mg/kg. The control group received sterilized PBS. The experimental groups consisted of $n = 6$ animals kept in individual containers, totalizing $n = 36$ animals. The animals were monitored until 96 h post-administration.

4.8.4 Effective dose of C liposomal formulation

To determine the protective effects of liposomal and free Fluopsin C, $n = 5$ animals were infected with 0.5 mL 10^8 CFU/mL of *K. pneumoniae* KPN-19 intraperitoneally, according to Navarro et al. [10]. Immediately after inoculation, 0.1 mL of free Fluopsin C or DSPE-PEG DMSO+Flp formulation was administered intravenously. Different dosages of both compounds were evaluated as single doses of 1×0.5 , 1×1 , and 1×2 mg/kg and double doses with an 8 h interval of 2×0.5 , 2×1 , and 2×2 mg/kg, totaling 6 groups for each one. DSPE-PEG DMSO control formulation was used as the liposomal control ($n = 5$) at 2×2 mg/kg dose since there was no antimicrobial activity observed *in vitro* for the liposomal components. The negative control group ($n = 5$) consisted of the administration of sterilized saline solutions intraperitoneally and PBS intravenously. The positive control group ($n = 5$) consisted of the administration of sterilized PBS intravenously. Totalizing, $n = 75$ animals.

4.8.5 Histopathological analysis of the most effective dose

Histopathological analyses were performed for assessment of acute toxicity (single dose, $n = 12$) and repeated doses toxicity (3 doses every 8 h, $n = 12$) [20]. Thus, healthy animals were administered with DSPE-PEG DMSO+Flp intravenous using the most effective dose (1×2 mg/kg). Controls were based on administration of the same liposomal formulation without the addition of Fluopsin C ($n = 12$) and sterilized PBS ($n = 12$). Totalizing, $n = 48$ animals.

1 The effects of the compounds administered were assessed 1-, 10-, 20-
2 , and 40 days post-treatment. At each point, 3 animals were euthanized
3 with the collection of the liver and kidney, which were immediately fixed
4 using a 4% paraformaldehyde solution. The organs were processed to the
5 obtention of histological slides and stained with hematoxylin/eosin.

6 Analysis of the organ's sections was performed in agreement with
7 Navarro et al. [10], consisting in the determination of hepatocyte nucleus
8 area ($n = 100$); mono- and binucleated number of hepatocytes, number of
9 hepatocytes with condensed chromatin and vacuolization [10].
10 Nephrotoxic effects were evaluated by determining the Bowman's space
11 area ($n = 10$), distal and proximal tubules diameter ($n = 50$), and nucleus
12 placement of tubules lining cells. The presence of inflammatory infiltrates,
13 hemorrhage, and necrosis was also determined for both organs. This
14 qualitative evaluation of the histological results was carried out by a
15 trained committee unrelated to the experiments, with samples identified
16 by code.
17

18 4.9 Statistical analysis

19 The results were averaged and are presented with the standard
20 deviation. Liposomal cytotoxicity *in vitro* assays were analyzed through
21 one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test, non-linear
22 regression was also used to infer the CC_{50} and CC_{90} . Histological section
23 images were processed using ImageJ and analyzed through two-way
24 ANOVA and Tukey's multiple comparison test. All tests considered $p <$
25 0.05 as indicative of significative differences. Raw data were processed
26 using GraphPad Prism v. 8.4.3 (GraphPad Software, Boston, MA, USA).
27 The study did not have humane endpoints.

28 All animals were included throughout the experiment, and no
29 experimental units or data points were excluded from the analysis. The
30 experiment was conducted, the results were evaluated, and the data was
31 analyzed by the same team, except for the qualitative evaluation of the
32 histopathological analysis, where an independent analysis trained
33 committee unrelated to the experiments formed for this purpose only,
34 with samples identified by code.

35 5. Conclusions

36 The present study reported for the first time the effect of
37 encapsulation of Fluopsin C, using the liposomal technique. Liposomal
38 Fluopsin C (DSPE-PEG DMSO+Flp) was spherical, monodisperse,
39 presented stability in its physicochemical characteristics, and was
40 effective in controlling MDR *K. pneumoniae*, *in vitro* and *in vivo* in mice,
41 promoting increased survival of infected animals. In addition, were
42 observed the reduction of cytotoxicity *in vitro* and *in vivo* conditions
43 showed healthy mice and increasing *in vitro* release time of Fluopsin C
44 encapsulated. Based on experimental data and previous studies by our
45 group, Fluopsin C is a promising compound to developing a new drug
46 due to its broad activity against MDR. Further study should be carried out
47 in another animal model, according to preclinical study guidelines, to
48 understand how antimicrobial activity of Fluopsin C does against MDR
49 *K. pneumoniae*.

50 **Funding:** This research was funded by the Brazilian National Council for
51 Scientific and Technological Development (CNPq), grant number

439754/2018-6 (AMR MCTIC) and 406016/2022-4, PPSUS-Aracauria Foundation-PR.

Appendix A

Table A1. Scoring table of qualitative histopathological analysis of liver and kidney after intravenous administration of one dose (acute toxicity) and three doses (repeated doses toxicity) of 2 mg/kg DSPE-PEG DMSO+Flp at times of 1, 10, 20, and 40 days. I: inflammatory infiltrate; H: hemorrhage; N: necrosis. 0 – absent; 1 – mild; 2 – moderate; and 3 – severe.

Liver	Acute toxicity			Repeated Doses toxicity			Liposomal Control			Negative Control		
	I	H	N	I	H	N	I	H	N	I	H	N
Time (days)												
1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	2
10	1	0	1	1	0	1	1	0	2	0	0	2
20	0	0	2	0	0	1	1	0	1	0	0	1
40	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	0	2
Kidney	Acute toxicity			Repeated Doses toxicity			Liposomal Control			Negative Control		
	I	H	N	I	H	N	I	H	N	I	H	N
Time (days)												
1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	2
10	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2
20	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	2
40	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	2

References

- World Health Organization (WHO). *WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. Geneva: World Health Organization; 2024, ISBN 978-92-4-010230-9.
- World Health Organization (WHO). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. 2017, ISBN 9789240026438.
- Kochan, T.J.; Nozick, S.H.; Medernach, R.L.; Cheung, B.H.; Gatesy, S.W.M.; Lebrun-Corbin M.; Mitra, S.D.; Khalatyan, N.; Fiorella, K.; Chao, Q.; et al. Genomic surveillance for multidrug-resistant or hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* among United States bloodstream isolates. *BMC Infectious Diseases* **2022**, *22*, 603, <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07558-1>
- Jacobs, D.M.; Safir, M.C.; Huang, D., Minhaj, F.; Parker, A.; Rao, G.G. Triple Combination Antibiotic Therapy for Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: A Systematic Review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **2017**, *16*, 1–12, <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0249-2>.
- Sheu, C.C.; Chang, Y.T.; Lin, S.Y.; Chen, Y.H.; Hsueh, P.R. Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Update on Therapeutic Options. *Front. Microbiol* **2019**, *10*, 80, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00080>.
- Laws, M.; Shaaban, A; Rahman, K.M. Antibiotic Resistance Breakers: Current Approaches and Future Directions. *FEMS Microbiology Reviews* **2019**, *43*, 490–516, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz014>.
- Da Silva, A.C.P.; Velasquez, P.A.G. Perfil De Resistência De *Klebsiella pneumoniae* Isoladas De Pacientes Da Unidade De Terapia Intensiva De Um Hospital No Sudoeste Do Paraná. *Disciplinarum Scientia | Saúde*. **2018**, *18*, 259-270, <https://doi.org/10.37777/2091>.

- 1 8. Centers for Disease Control and Prevention. *Antibiotic resistance threats in the United States*. Atlanta: CDC.
2 114. 2013.
- 3 9. Afonso, L.; Grzegorzczak, K.G.; Salomão, J.M.; Basso, K.R.; Alves, L.C.; Silva, M.C.D.; Chryssafidis, A.L.;
4 Gionco-Cano, B; Yamada-Ogatta, S.F.; Andrade, G. Fluopsin C Promotes Biofilm Removal of XDR
5 *Acinetobacter baumannii* and Presents an Additive Effect with Polymyxin B on Planktonic Cells. *Antibiotics*
6 **2024**, *13*, 875, <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090875>.
- 7 10. Navarro, M.O.P.; Simionato, A.S.; Pérez, J.C.B.; Barazetti, A.R.; Emiliano, J.; Niekawa, E.T.G.; Andreato,
8 M.F.L; Modolon, F.; Dealis, M.L.; Araújo, E.J.A. et al. Fluopsin C for Treating Multidrug-resistant
9 Infections: *In vitro* Activity against Clinically Important Strains and *in vivo* Efficacy Against
10 Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol* **2019**, *10*, 2431,
11 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02431>.
- 12 11. Kerbauy, G.; Vivian, A.C.P.; Glenda, S.C.; Simionato, A.S.; Pelisson, M.; Vespero, E.; Costa, S.F.; Andrade,
13 C.G.T.J.; Barbieri, D.M.; Mello, J.C.P. et al. Effect of a Metalloantibiotic Produced by *Pseudomonas aeruginosa*
14 on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. *Curr. Pharm. Biotechnol* **2016**, *17*,
15 389–397, <https://doi.org/10.2174/138920101704160215171649>.
- 16 12. Cardozo, V.F.; Oliveira, A.G.; Nishio, E.K.; Perugini, M.R.E.; Andrade, C.G.T.J.; Silveira, W.D.; Durán, N.;
17 Andrade, G.; Kobayashi, R.K.T; Nakazato, G. Antibacterial Activity of Extracellular Compounds Produced
18 by a *Pseudomonas* Strain against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann. Clin.*
19 *Microbiol. Antimicrob* **2013**, *12*, <https://doi.org/10.1186/1476-0711-12-12>.
- 20 13. Egawa, Y.; Umino, K.; Awataguchi, S.; Kawano, Y.; Okuda, T. Antibiotic YC 73 of *Pseudomonas* origin. I.
21 Production, Isolation and Properties. *J. Antibiot* **1970**, *23*, 267–270,
22 <https://doi.org/10.7164/antibiotics.23.267>.
- 23 14. Sharma, D. Fluopsin C: a potential candidate against the deadly drug-resistant microbial infections in
24 humans. *Future Microbiol* **2020**, *15*, 381-384, <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0307>.
- 25 15. Catalano, A.; Iacopetta, D.; Ceramella, J.; Scumaci, D.; Giuzio, F.; Saturnino, C.; Stefano, A.; Rosano, C.;
26 Sinicropi, M.S. Multidrug resistance (MDR): A widespread phenomenon in pharmacological
27 therapies. *Molecules* **2022**, *27*, 616, <https://doi.org/10.3390/molecules27030616>.
- 28 16. Alarfaj, R.E.; Alkhulaifi, M.M.; Al-Fahad, A.J.; Aljihani, S.; Yassin, A.E.B.; Alghoribi, M.F.; Halwani, M.A.
29 Antibacterial efficacy of liposomal formulations containing tobramycin and N-acetylcysteine against
30 tobramycin-resistant *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Acinetobacter baumannii*. *Pharmaceutics* **2022**,
31 *14*, 130, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010130>.
- 32 17. Alavi, S.E.; Esfahani, M.K.M.; Raza, A.; Adelnia, H.; Shahmabadi, H.E. PEG-grafted liposomes for
33 enhanced antibacterial and antibiotic activities: An *in vivo* study. *NanoImpact* **2022**, *25*, 100384,
34 <https://doi.org/10.1016/j.impact.2022.100384>.
- 35 18. Khan, A.A.; Allemailem, K.S.; Almatroodi, S.A.; Almatroudi, A.; Rahmani, A.H. Recent strategies towards
36 the surface modification of liposomes: an innovative approach for different clinical applications. *3 Biotech*
37 **2020**, *10*, 1-15, <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2144-3>.
- 38 19. Li, M.; Du, C.; Guo, N.; Teng, Y.; Meng, X.; Sun, H.; Li, S.; Yu, P.; Galons, H. Composition design and
39 medical application of liposomes. *European journal of medicinal chemistry* **2019**, *164*, 640-653,
40 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.007>.
- 41 20. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia*
42 *e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos*, 2nd ed.; Gerência de Avaliação de
43 Segurança e Eficácia: Brasília, Brasil. **2013**; 48.
- 44 21. Wang, D. Y.; Van der Mei, H.C.; Ren, Y.; Busscher, H.J.; Shi, L. Lipid-based antimicrobial delivery-systems
45 for the treatment of bacterial infections. *Frontiers in chemistry* **2020**, *7*, 872,
46 <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00872>.

- 1 22. Eleraky, N.E.; Allam, A.; Hassan, S. B.; Omar, M.M. Nanomedicine fight against antibacterial resistance:
2 an overview of the recent pharmaceutical innovations. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 142,
3 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020142>.
- 4 23. Weaver, E.; Macartney, R.A.; Irwin, R.; Uddin, S.; Hooker, A.; Burke, G.A.; Wylie, M.P.; Lamprou, D.A.
5 Liposomal encapsulation of amoxicillin via microfluidics with subsequent investigation of the significance
6 of PEGylated therapeutics. *International Journal of Pharmaceutics* **2024**, *650*, 123710,
7 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123710>.
- 8 24. Shah, V.M.; Nguyen, D.X.; Patel, P.; Cote, B.; Al-Fatease, A.; Pham, Y.; Huynh, M.G.; Woo, Y.; Alani,
9 A.W.G. Liposomes produced by microfluidics and extrusion: A comparison for scale-up
10 purposes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2019**, *8*, 146-156,
11 <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.02.019>.
- 12 25. Gonzalez Gomez, A.; Hosseinioust, Z. Liposomes for antibiotic encapsulation and delivery. *ACS*
13 *infectious diseases* **2020**, *6*, 896-908, <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00357>.
- 14 26. Nsairat, H.; Khater, D.; Sayed, U.; Odeh, F.; Al Bawab, A.; Alshaer, W. Liposomes: Structure, composition,
15 types, and clinical applications. *Heliyon* **2022**, *8*, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>.
- 16 27. Wang, Y.; Grainger, D.W. Lyophilized liposome-based parenteral drug development: Reviewing complex
17 product design strategies and current regulatory environments. *Advanced drug delivery reviews* **2019**, *151*,
18 56-71, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.03.003>.
- 19 28. Scriboni, A.B.; Couto, V.M.; Ribeiro, L.N.D.M.; Freires, I.A.; Groppo, F.C.; De Paula, E.; Franz-Montan, M.;
20 Cogo-Müller, K. Fusogenic liposomes increase the antimicrobial activity of vancomycin against
21 *Staphylococcus aureus* biofilm. *Frontiers in Pharmacology* **2019**, *10*, 1401,
22 <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01401>.
- 23 29. Liu, P.; Chen, G.; Zhang, J. A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved
24 products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules* **2022**, *27*, 1372,
25 <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>.
- 26 30. Werner, J.; Umstätter, F.; Hertlein, T.; Beijer, B.; Kleist, C.; Mühlberg, E.; Zimmermann, S.; Haberkorn, U.;
27 Ohlsen, K.; Fricker, G.; et al. Improved pharmacokinetics and enhanced efficacy of the vancomycin
28 derivative FU002 using a liposomal nanocarrier. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2024**,
29 *56*, 102731, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2023.102731>.
- 30 31. Pushparaj Selvadoss, P.; Nellore, J.; Balaraman Ravindran, M.; Sekar, U. Novel pyochelin-based
31 PEGylated liposomes for enhanced delivery of antibiotics against resistant clinical isolates of *Pseudomonas*
32 *aeruginosa*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **2017**, *46*, 2043-2053,
33 <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1408119>.
- 34 32. Briuglia, M.L.; Rotella, C.; McFarlane, A.; Lamprou, D.A. Influence of cholesterol on liposome stability and
35 on *in vitro* drug release. *Drug delivery and translational research* **2015**, *5*, 231-242, [s://doi.org/10.1007/s13346-](https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8)
36 [015-0220-8](https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8).
- 37 33. Fan, X.; Fan, J.; Wang, X.; Wu, P.; Wu, G. S-thanatol functionalized liposome potentially targeting
38 on *Klebsiella pneumoniae* and its application in sepsis mouse model. *Frontiers in Pharmacology* **2015**, *6*, 249,
39 <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00249>.
- 40 34. Simionato, A.S.; Cano, B.G.; Navarro, M.O.P.; Tavares, E.R.; Ribeiro, R.A.; Hungria, M.; Yamauchi, L.M.;
41 Yamada-Ogatta, S.F.; Andrade, G. Whole-Genome Sequence of Bioactive Compound-Producing
42 *Pseudomonas aeruginosa* Strain LV. *Microbiology Resource Announcements* **2021**, *10*,
43 <https://doi.org/10.1128/mra.01120-20>.
- 44 35. Rampazo, L.G.L. Evaluation of Biological Agents and their Products on the Incidence of Citrus Canker
45 Foliar Lesions. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina,
46 Brasil, 2004.

- 1 36. Andrade, G. *Processo de Produção, Purificação e Obtenção de Substâncias Com Atividades Antibióticas Para o*
2 *Controle de Doenças Causadas Por Bactérias Em Plantas*. BR PI 0803350-1, 10 September 2008.
- 3 37. Bedoya, J.C.; Dealis, M.L.; Silva, C.S.; Niekawa, E.T.G.; Navarro, M.O.P.; Simionato, A.S.; Modolon, F.;
4 Chryssafidis, A.L.; Andrade, G. Enhanced production of target bioactive metabolites produced by
5 *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Biocatalysis and agricultural biotechnology* **2019**, *17*, 653-664,
6 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.025>.
- 7 38. Ribeiro, L.N.M.; de Paula, E.; Rossi, D.A.; Monteiro, G.P.; Júnior, E.C.V.; Silva, R.R.; Franco, R.R.;
8 Espíndola, F.S.; Goulart, L.R.; Fonseca, B. B. Hybrid pectin-liposome formulation against multi-resistant
9 bacterial strains. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 769, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080769>.
- 10 39. Chierrito, D.; Villas-Boas, C.B.; Tonin, R.S.; Fernandez-Limos, F.; Sanches, A.C.C.; Mello, J.C.P. Using cell
11 cultures for the investigation of treatments for Attention Deficit Hyperactivity Disorder: systematic
12 review. *Current Neuropharmacology* **2019**, *17*, 10, 916-925,
13 <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190409143155>.
- 14 40. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility*
15 *Testing*. 31st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, **2021**.

1 5 CONCLUSÃO

2 O presente estudo relata pela primeira vez o uso do encapsulamento
3 de Fluopsina C, utilizando a técnica lipossomal. A Fluopsina C lipossomal (DSPE-PEG
4 DMSO+Flp) foi eficaz no controle de *K. pneumoniae* MDR, tanto *in vitro* como *in vivo*
5 em camundongos, promovendo aumento da sobrevivência em modelo de bacteremia
6 sanguínea. Além disso, houve redução da citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* em
7 camundongos saudáveis, além do prolongamento do tempo de liberação *in vitro*. Com
8 base em dados experimentais e estudos anteriores do nosso grupo, a Fluopsina C
9 lipossomal é uma candidata promissora como novo medicamento antimicrobiano
10 devido à sua ampla atividade contra MDR.

11 Estudos futuros devem explorar os efeitos citotóxicos em outros
12 órgãos, especialmente em longo prazo, farmacocinética e dissociação em compostos
13 secundários, assim como, outros usos da Fluopsina C lipossomal e outros
14 encapsulamentos para viabilizar seu uso em diferentes formas de aplicação.