



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MIGUEL OCTAVIO PÉREZ NAVARRO

**AVALIAÇÃO CITOLÓGICA E DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA EM CAMUNDONGOS DO COMPOSTO
PRODUZIDO POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA LV
SOBRE ISOLADOS CLÍNICOS MULTIRRESISTENTES**

MIGUEL OCTAVIO PÉREZ NAVARRO

**AVALIAÇÃO CITOLÓGICA E DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA EM CAMUNDONGOS DO COMPOSTO
PRODUZIDO POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA LV
SOBRE ISOLADOS CLÍNICOS MULTIRRESISTENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

Londrina
2017

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

Navarro, Miguel Octavio Pérez.

Avaliação citológica e da atividade antimicrobiana em camundongos do composto produzido por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sobre isolados clínicos multirresistentes / Miguel Octavio Pérez Navarro. - Londrina, 2017.

111 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.

Coorientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia médica - Tese. 2. Antibióticos - Tese. 3. Drogas - Resistência em microorganismos - Tese. 4. *Pseudomonas aeruginosa* - Tese. I. Andrade Filho, Galdino. II. Oliveira Júnior, Admilton Gonçalves de. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

MIGUEL OCTAVIO PÉREZ NAVARRO

**AVALIAÇÃO CITOLÓGICA E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM
CAMUNDONGOS DO COMPOSTO PRODUZIDO POR
PSEUDOMONAS AERUGINOSA CEPA LV SOBRE ISOLADOS
CLÍNICOS MULTIRRESISTENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Celligoi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Andreas Lazaros Chryssafidis
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Daniela Cristina de Medeiros
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo
Universidade de São Paulo – USP

Londrina, 09 de outubro de 2017.

As minhas consignas sempre são Deus,
Aleja e Emanuel

AGRADECIMENTOS

Estes agradecimentos vão além de uma formalidade, está é a melhor forma de expressar o significativamente importante que foi a sua presença na minha trajetória doutoral.

Primeiramente agradeço a essa energia que guia meu caminhar (Deus) por me demonstrar dia a dia que fazer o correto só traz benefício. Assim mesmo, espero essa energia seja transmitida fornecendo de muita felicidade e abençoes a:

Meus preciosos Alejandra e Emanuel por dar sentido a minha vida. A minha família na Colômbia pelo apoio e motivação.

O Professor Dr. Galdino Andrade meu orientador, por me aceitar e por ter me brindado a oportunidade desta aventura, permitindo trabalhar no LEM (Laboratório de Ecologia Microbiana) e retornar à labor que mais desfruto, a pesquisa.

A Família do LEM, todas essas pessoas que desde 2013 me abrigaram, ensinaram e treinaram, brindando a sua parceria e amizade e contribuindo para o desenvolvimento positivo deste trabalho.

As coordenadoras Sueli e Lucy e demais professores do PPM, pela condução e acompanhamento durante o doutorado.

As Agências CAPES, CNPq, ICETEX pelo apoio financeiro, tanto para o desenvolvimento do projeto como para o meu sustento no Brasil e na Noruega.

Que a humildade e o respeito vençam a soberba, orgulho e arrogância... por que de nada serve um doutor se não é um exemplo de valores.

NAVARRO, Miguel Octavio Péres. **Avaliação citológica e da atividade antimicrobiana em camundongos do composto produzido por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sobre isolados clínicos multirresistentes**. 2017. 111 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O surgimento de organismos multirresistentes (MR) aumenta mais rápido que o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos, causando uma crise na saúde pública mundial. Neste estudo o desenvolvimento de um composto antimicrobiano foi realizado, avaliando o risco de resistência da molécula e o seu potencial de ser um novo fármaco. Um composto organocúprico antibiótico (OAC) foi avaliado contra isolados clínicos MR, *in vitro* e *in vivo*. OAC foi produzido em cultura submersa de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV, purificado por cromatografia líquida de absorção e identificado por análises espectrométricas. A bioatividade, risco de resistência, toxicidade e eficácia foram determinadas. OAC foi identificado como fluopsina C com MIC's e MBC's <2 µg.mL⁻¹ e baixas frequências de resistência. Os camundongos tratados com uma única dose de 2 mg.Kg⁻¹ e duas doses de 1 mg.Kg⁻¹.8h⁻¹ de fluopsina C, apresentaram uma dose protetiva (DP₅₀) em 72 horas após os tratamentos. A substância fluopsina C produziu alterações moderadas no fígado, porém não apresentou nefrotoxicidade nos camundongos. Este novo estudos fornecem resultados que possibilitam a ideia de continuar avaliando fluopsina C para o desenvolvimento de um novo fármaco com atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Antibiótico. Fluopsina C. Organometálico. Resistência microbiana.

NAVARRO, Miguel Octavio Peres. **Cytological evaluation and antimicrobial activity in mice of the compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain LV on multiresistant clinical isolates.** 2017. 111 p. Thesis (Doctorate in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The emergence of multidrug-resistant (MDR) organisms increases faster than the development of new antibiotic compounds, causing a global public health crisis. In this study the development of antimicrobial products was carried out focusing on the tests that determine the risk of resistance of molecules with potential to be a new drug. An organometallic compound (OAC) was evaluated against MDR clinical isolates, both *in vitro* and *in vivo*. OAC was produced in submerged culture by *Pseudomonas aeruginosa* strain LV, purified by liquid absorption chromatography and identified by spectrometric analysis. Bioactivity, risk of resistance, toxicity, and efficacy were determined. The results presented MIC and MBC $<2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and low resistance frequencies. OAC was identified as fluopsin C with MIC's and MBC's $<2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and low mutant frequencies. Mice treated with a single dose of 2 mg.kg^{-1} and two doses of $1 \text{ mg.Kg}^{-1} \cdot 8\text{h}^{-1}$ of fluopsin C showed a DP_{50} at 72 hours post-treatment. Fluopsin C causes moderate changes in the liver, but no nephrotoxicity in the mice. These new studies with this old antibiotic molecule provide results that enable the idea of continuing to evaluate fluopsin C for the development of a new drug with antibiotic activity.

Keywords: Antibiotic. Fluopsin C. Organometallic. Microbial resistance.

LISTA DE TABELAS

REVISSÃO BIBLIOGRAFICA

Tabela 1 – Linha do tempo da descoberta, introdução e resistência de antibióticos.	20
Tabela 21 – Requisitos e características dos diferentes tipos de estudos in vivo na fase pré-clínica.	36
Tabela 31 – Etapas da pesquisa clínica.....	37

ARTIGO A

Table 11 – Antibiotic supernatant activity produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LV strain with different concentration of CuCl ₂ .2H ₂ O against Xcc306 by the well-diffusion method in agar. Inhibition zone diameter [mean ± sd ¹ (mm)] at different fermentation days.....	71
Table 21 – The OAC susceptibility tests disc diffusion on agar (10 µg.Disc ⁻¹), MIC, MBC, MPC and mutant frequencies for parent strain and RMs.....	71

ARTIGO B

Table 31 – Qualitative analysis of the liver of mice at 1, 10, 20 and 40 days after treatment with 2mg/Kg of fluopsin C (T) or placebo (C)	103
Table 41 – Quantification of hepatocytes with vacuolated cytoplasm and displaced nucleus (10 fields) of mice at 1, 10, 20 and 40 days after treatment with 2mg/Kg of fluopsin C (T) or placebo (C).	104
Table 51 – Qualitative analysis of the kidney of mice at 1, 10, 20 and 40 days after treatment with 2mg/Kg of fluopsin C (T) or placebo (C)	105

LISTA DE FIGURAS

REVISSÃO BIBLIOGRAFICA

- Figura A11** – Esquema geral do protocolo para determinação do risco de mutantes resistentes a novos compostos bioativos 53
- Figura A21** – Arranjo da microplaca de 96 poços. Cada coluna é inoculada com um microrganismo diferente (até 12 estirpes), em quanto as filas tem concentrações crescentes do composto antimicrobiano..... 54
- Figura A31** – Exemplo de gráfico de linhas, apresentando duas estirpes diferentes e seu potencial para gerar mutantes resistentes ao novo composto bioativo. 55
- Figura A41** – Determinação de frequências e concentração que prevê mutantes (MPC) para todas as estirpes, original, mutantes resistentes e mutante revertida. 56

ARTIGO I

- Figure 11** – Production of OAC in NB with different concentrations of copper chloride dehydrate at various fermentation times. (*) Capital letters different have significant differences between treatments on the same day and (**) Lowercase letters different present significant differences on the days of fermentation for the same treatment - 72
- Figure 21** – Loss in susceptibility of *S. aureus*, *E. faecium* and *K. pneumoniae* 21 serial passage on OAC-containing MHB (OAC-RM21) and the final MIC when the mutants are serially pegged for 10 days in OAC free medium (OAC-RM+10). - 73
- Figure 31** – OAC-MPC determination with *S. aureus* (MRSA N315 and MRSA BEC9393), *E. faecium* (ATCC6569 and VRE 170) and *K. pneumonia* (ATCC 10031 and CRE-Kpn19) parent and OAC-RMs strains - 70

Figure 41 –	Scanning electron micrographs (SEM). (A) Above, control (not treated), large number of <i>Klebsiella pneumoniae</i> present with intact appearance and high extracellular polysaccharides production. Down, <i>K. pneumoniae</i> treated with fluopsin C (1h), showing decreased number of bacteria presenting a disruption of the cell wall forming depressions in the configuration of the bacterial skeleton and lessened of extracellular matrix. (B) Above, MRSA-N315 control, great number of bacteria with intact appearance and high extracellular polysaccharides production. Down, MRSA-N315 strain treated with fluopsin C (1h), showing decreased number of bacteria and extracellular matrix.-	71
Figure 51 –	Transmission electron micrographs. A) Control (above) and fluopsin C-treated cells (down) of <i>K. pneumoniae</i> . B) Control (above) and OAC-treated cells (down) of MRSA. TEM studies enabled us to demonstrate that OAC-induced internal cell damage.-.....	72
Fig. S11 –	HPLC chromatogram of CF4 fraction in different wavelengths (264, 220, 210, 316, 250, 366, 230, 290 nm, respectively). The peak with retention time of 3.611 min was quantified ($R^2 = 0.999$) and collected.-.....	75
Fig. S21 –	ESI-MS (positive mode) of the natural organocopper antibiotic compound (OAC) produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LV strain. Mass = 265.92 <i>m/z</i> ,-.....	75
Fig. S31 –	¹ H NMR of the organocopper antibiotic compound (OAC) produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LV strain (300 MHz; CDCl ₃)-.....	76
Fig. S41 –	Chemical structure of organocopper antibiotic compound (OAC) identical to fluopsin C. -.....	80
Fig. S51 –	Cytotoxicity analysis with MTT assay in LLCMK2 cells after 72h of treatment. fluopsin C was added in different concentration of 0 - 32 ug.mL ⁻¹ -	77

ARTIGO II

Fig. 61 –	Cytotoxicity and Hemolytic analysis. Cells after 24 h of treatment with different concentrations of fluopsin C-	110
Fig. 71 –	Effect of antibiotic on survival of <i>Tenebrio molitor</i> larvae (A) and mice (B). Treatment with different concentrations of fluopsin C in 8 days and 96 hours of observation, respectively.-	107
Fig. 81 –	Efficacy in an experimental infection murine model. Control (i) and 5 different Treatment (ii - vi) with fluopsin C in septicemia protection model using CRE-Kpn19. Survival is depicted 96 h after infection. -	108
Fig. 91 –	Micrograph of the liver of mice and mice after 10 days of treatment with fluopsin C or placebo. The control group (A and C) showed a slight vacuolization in the cytoplasm of hepatocytes (arrow) and discrete inflammatory infiltrate (asterisk). While treated with fluopsin C (B and D) presented moderate vessel congestion (cross), marked vacuolization of the cytoplasm (arrow), moderate inflammatory infiltrate (asterisk) and moderate hemorrhage (arrowhead). Similar images were observed in other fields and on all days. Color: H.E. Scale bar: 25 mm. -	109
Fig. 101 –	Box plots. (A) Area of 400 nucleus of hepatocytes, (B) area of 400 Bowman´s space, (C) diameters of 200 proximal tubule and (D) diameters of 200 distal tubule. The median (-) and mean (+) of each treatment for the sums of the all times.-	110
Fig. 111 –	Photomicrograph of the renal cortex of mice and mice after 10 days of treatment with fluopsin C or placebo.-	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC	<i>Center of Diseases Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CRE	Carbapenem-resistant Enterobacteria
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
F _{Sm}	Fermentação Submersa
FSS	Fermentação em Estado Sólido
H.E.	<i>hematoxylin and eosin</i>
HTS	High Throughput Screening
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LD	<i>Lethal Doses</i>
LI	<i>Lethal inoculum</i>
LV	Lesão Velha
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MHA	<i>Mueller Hinton Agar</i>
MHB	<i>Mueller Hinton Broth</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MPC	<i>Mutant Prevention Concentration</i>
MR	<i>Multidrug-resistant</i>
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MTT	<i>Dimethylthiazol Diphenyl Tetrazolium Bromide</i>
NA	<i>No Ativity</i>
NB	<i>Nutrient Broth</i>
OAC	<i>Organocopper Antibiotic Compound</i>
OMR	Organismo multirresistente
PD	<i>Phase Dichlometane</i>
PD	<i>Protective Dose</i>
PDR	<i>Pandrug-resistant</i>
PN	Produtos Naturais
RA	Resistência Antimicrobiana
RM	<i>Resistant mutant</i>
RPM	Rotações por Minuto

RPMI *Roswell Park Memorial Institute (medium)*
SEM *Scanning Electronic Microscopy*
TEM *Transmission Electronic Microscopy*
VRE *Vancomycin Resistant Enterococcus*

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	GERAL	19
2.2	ESPECÍFICOS.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	OS ANTIMICROBIANOS E A MULTIRRESISTÊNCIA.....	18
3.2	DESENVOLVIMENTO DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS	23
3.2.1	Fase de Descoberta	24
3.2.1.1	Bioprospecção.....	25
3.2.1.2	Produção de antimicrobianos	27
3.2.1.3	Extração e purificação de antimicrobianos	28
3.2.1.4	Caracterização molecular.....	30
3.2.1.5	Avaliação da atividade antimicrobiana	30
3.2.1.6	Testes de monitoramento.....	31
3.2.1.6.1	<i>Confronto direto</i>	31
3.2.1.6.2	<i>Testes com sobrenadante ou extratos</i>	32
3.2.1.7	Testes pro-clínicos	32
3.2.1.8	Testes de resistência ao antimicrobiano	33
3.2.2	Fase Pré-Clínica.....	34
3.2.2.1	Testes pré-clínicos sem uso de animais.....	35
3.2.2.2	Testes pré-clínicos com animais	35
3.2.3	Fase clínica	36
4	PERSPECTIVAS	41
5	REFERÊNCIAS	42

6	ANEXO A	53
7	ARTIGO I	58
8	ARTIGO II	83
9	CONCLUSÃO	111

INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são um grupo quimicamente heterogêneo de compostos orgânicos que são deletérios para o crescimento ou atividade metabólica de outros microrganismos. A maioria dos antimicrobianos comerciais são derivados de produtos do metabolismo de microrganismos que competem entre si no ambiente em que vivem, inibindo o crescimento ou desenvolvimento uns dos outros (NEWMAN; CRAGG, 2016). Nesse aspecto, bactérias ambientais são promissoras na busca de novos antimicrobianos, já que compostos isolados destas bactérias apresentam diferentes mecanismos de ação, como inibição da síntese proteica, inibição de RNA polimerase e interferência na síntese da parede celular (KUMAR; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2014). Na atualidade o uso de antibióticos para controle das infecções hospitalares contribui para melhorar a qualidade de vida das pessoas. Porém, o aumento da população, o incremento das infecções associadas aos serviços de saúde e a resistência aos antimicrobianos é um desafio para a indústria farmacêutica.

A intensa pressão seletiva, o uso indiscriminado de antimicrobianos e as práticas impróprias para controle de infecções causadas por bactérias, fungos e vírus, contribuem para a evolução e disseminação de organismos multirresistentes (OMR). Os OMR desafiam até os medicamentos de última geração, tornando-se uma ameaça para o tratamento eficaz das infecções e uma questão de segurança global (SPELLBERG, 2014; WHO, 2014).

A resistência aos antimicrobianos se tornou um sério problema de saúde pública. Mais de dois milhões de infecções e 23 mil mortes foram causadas por OMR apenas nos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Preventions- CDC). O controle destas infecções repercute na economia dos países, sendo que nos Estados Unidos e na Europa os custos de saúde devido à multirresistência (MR) excedem os US\$20 bilhões e 1,6 € bilhões, respectivamente. Este elevado excesso nos custos é justificado pelo uso de antimicrobianos de última geração, conseqüentemente mais caros, além, de um aumento no período de hospitalização para pacientes com infecções de difícil tratamento (ROBERTS et al., 2009; FAIR; TOR, 2014). A situação é mais preocupante para o Brasil e países da América Latina, em geral, pois têm níveis mais elevados de resistência bacteriana nos grupos patogênicos de maior importância clínica, em comparação com a Europa e os

Estados Unidos (MAGIORAKOS et al., 2012; LAXMINARAYAN et al., 2013). No Brasil, por exemplo, OMR são responsáveis por mais de 20 mil mortes por ano (WHO, 2014).

As infecções hospitalares causadas pelos OMR constituem um risco à saúde pública do mundo. Estima-se que mais de 70% dos isolados clínicos bacterianos envolvidos nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobianos usados convencionalmente na prática clínica (WHO, 2014). Dentro dos OMR os patógenos bacterianos de maior importância nas IRAS é o denominado grupo ESKAPE - *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter species* - (RICE, 2008).

Dentro deste grupo, as estirpes que apresentam maiores riscos para as IRAS, pelas crescentes taxas de resistência aos antibióticos, entre outros fatores, são as bactérias Gram positivas resistentes aos glicopeptídeos tal como *Enterococcus* e *Staphylococcus* resistentes à vancomicina (VRE e VRS, respectivamente), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e bactérias Gram negativas, como Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos (CRE), entre elas as bactérias produtoras da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

Assim, os riscos à saúde associados à proporção de infecções nos serviços de saúde causados por OMR, incluindo o seu potencial para produzir infecções invasivas, o difícil controle nos pacientes infectados particularmente nos mais vulneráveis, e a sua resistência à múltiplos antibióticos, a qual tem aumentado significativamente nas últimas décadas, é o principal desafio tendo em vista o baixo índice de sucesso nos tratamentos. Para o caso das infecções causadas por MRSA, VRE e CRE, os fracassos na antibiótico-terapia estão relacionados a inúmeros fatores, tais como severidade da infecção, diagnóstico e tratamentos tardios, e, principalmente, a baixa efetividade dos antimicrobianos disponíveis no mercado (SPELLBERG; GILBERT, 2014)

As opções terapêuticas para o tratamento das infecções relacionadas aos OMR continuam limitadas. Alguns antimicrobianos ainda mantêm atividade contra algumas estirpes MR (vancomicina, colistina, tigeciclina, fosfomicina), porém, com restrições de sítios de ação e efeitos tóxicos (LIVERMORE, 2011; WISE, 2011). Na atualidade, existem poucos relatos de novas classes de antimicrobianos em etapas

avançadas de desenvolvimento com atividade contra OMR sobretudo Gram negativos e essa estagnação de novos produtos está levando ao aumento das taxas de morbimortalidade entre essa classe de bactérias. As taxas de mortalidade atribuídas a infecções com OMR, em média é maior que 50%. (WHO, 2014). Assim, a necessidade de implementar novas estratégias para controlar a disseminação de OMR, incluindo a busca de novos fármacos com atividade antimicrobiana, é uma prioridade mundial nos centros de pesquisa.

Assim, a busca por microrganismos com potencial de uso como agente de biocontrole e/ou a obtenção de compostos do metabolismo com ação antimicrobiana, é uma das alternativas para o controle de patógenos, principalmente as cepas multirresistentes. *Pseudomonas* é um gênero bacteriano que contém espécies de relevância industrial, agrícola e médica devido a sua diversidade metabólica e habilidade para colonizar uma ampla variedade de nichos ecológicos, sendo habitantes comuns do solo, água, plantas e animais, além disso, são facilmente isoladas, cultivadas e manipuladas geneticamente em laboratório. A diversidade biosintética do gênero *Pseudomonas*, inclui a produção de antimicrobianos e se destaca como um dos mais estudados agentes de biocontrole nas últimas décadas (DE OLIVEIRA ET AL., 2016)

No Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, há mais de 15 anos avalia-se a atividade antibiótica de compostos produzidos por bactérias. Em estudos preliminares, foi verificada a bioatividade de compostos obtidos de uma cultura de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV (Patente PI0803350-1 – INPI 12/09/2009), contra uma variedade de agente patogênicos agrícolas como *Xanthomonas citri*, *X. oxonopodis*, causadores do cancro cítrico, e patógenos de importância clínica onde se incluem, isolados OMR, como SARM, ERV e ERC. Em todos os casos, tanto agrícola como clínico, foram obtidos resultados promissores (MURATE et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2016; KERBAUY et al., 2016). Alguns desses compostos bioativos já foram classificados, entre eles uma substância organometálica com grande atividade antimicrobiana a qual é unicamente produzida na presença do cobre no meio de cultura. Em vista do grande potencial, foi necessário purificar, identificar e avaliar o composto organocúprico para determinar se este antimicrobiano pode ser usado comercialmente, sendo essa a principal finalidade.

OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade citológica e antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* do composto organocúprico (OAC) produzido por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sobre isolados clínicos multirresistentes.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e o tempo de fermentação na produção do composto organometálico antimicrobiano (OAC) produzido por *P. aeruginosa* cepa LV em cultura submersa.

Purificar e Identificar a substância com atividade antibiótica produzida pela cepa LV mediante métodos cromatográficos e espectroscópicos.

Determinar a concentração inibitória e bactericida mínima, e a seleção de mutantes resistentes ao OAC sobre isolados clínicos multirresistentes.

Avaliar o efeito hemolítico e citotóxico da substância antibiótica *in vitro*.

Avaliar a toxicidade do OAC utilizando um modelo invertebrado com larvas de *Tenebrio molitor*.

Determinar a ação antibiótica *in vivo* do composto puro sobre um isolado clínico multirresistente em um modelo de sepses com camundongos Swiss albino.

Avaliar o efeito tóxico do composto antibiótico em camundongos Swiss albino por estudos histológicos dos rins e fígado.

Detectar o OAC em soro após administração intravascular em camundongos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 OS ANTIMICROBIANOS E A MULTIRRESISTÊNCIA

O estudo das moléculas orgânicas bioativas de ocorrência natural foi impulsionado principalmente pela curiosidade química, mas, recentemente, novos e melhorados agentes antibacterianos estão sendo ativamente e intensamente procurados pela necessidade de terapias mais eficientes para combater a capacidade das bactérias para adquirir resistência (PATRICK, 2017). Esta resistência microbiana é definida como a capacidade que os microrganismos têm para se multiplicar na presença de concentrações acima das doses terapêuticas de um determinado medicamento (FRIEDMAN, TEMKIN e CARMELI, 2016) e é medida observando a capacidade das células de crescer na presença do antibiótico.

Assim, microrganismos resistentes ao menos a um agente, em três ou mais classes, dos antimicrobianos testados contra esse patógeno são denominadas multirresistentes (*multidrugresistant* – MDR), já quando o isolado não é suscetível ao menos a um agente antimicrobiano entre todas as classes testadas, com exceção de duas ou menos classes denomina-se extensivamente resistentes (*extensively drug-resistant* – XDR) e os organismos pan-resistentes (*pandrug-resistant* – PDR) engloba aqueles resistentes a todos os agentes antimicrobianos em todas as classes testadas (MAGIORAKOS, et al., 2012). Por seu lado, células persistentes (*persisters cells*) representam uma pequena subpopulação de células tolerantes que quando tratadas com um antibiótico sobrevivem entrando espontaneamente em um estado dormente, sem divisão, mas com o antibiótico ligado a seu local de ação, contrário aos mecanismos de resistência que impedem que os antibióticos se liguem aos seus alvos (LEWIS, 2010)

Os mecanismos de resistência aos fármacos podem surgir devido a uma variedade de fatores, entre eles, modificações do sítio alvo do bioativo, inativação e degradação do composto por ação enzimática, bombas de efluxo e alteração da permeabilidade da membrana como perda de porinas (WATKINS e BONOMO, 2016). Porém, previamente a célula deve ter as informações genéticas necessárias, as quais podem ser obtidas por mutação ou pela transferência de genes entre células principalmente por transdução e conjugação (PATRICK, 2017). Na Tabela 1

se apresenta cronologicamente a descoberta, introdução e resistência dos principais antibióticos.

Atualmente, estimasse que 60% das cepas de *Streptococcus. Pneumoniae* e *S. aureus* são resistente a β -lactâmicos e metilina, respectivamente. A descoberta de genes que podem ser facilmente transferidos entre diferentes tipos de bactérias, levando ao rápido desenvolvimento de resistência aos antibióticos de última geração como vancomicina, carbapenem e colistina, preocupa a toda a comunidade científica (O'NEILL, 2014). De fato, alguns isolados bacterianos associados a infecções de urina e de feridas são resistentes a todos os antibióticos conhecidos sendo intratável, e muitos dos atuais procedimentos cirúrgicos avançados se tornam demasiado arriscado para serem realizados, devido aos altos riscos de infecção dentro das IRAS (PATRICK, 2017).

A habilidade das bactérias para tolerar ou bloquear a ação dos medicamentos é um desafio sempre presente, uma vez que qualquer uso de antimicrobianos, mesmo de maneira apropriada, contribui para o desenvolvimento de resistência (HOLMES et al., 2015). Assim, a descoberta de novos agentes antibacterianos com potencial terapêutico de uma forma constante e progressiva é urgente, para diminuir os índices de mortalidade que para o 2050 projetasse que seja de 10 milhões de óbitos por ano, a um custo de US\$ 100 trilhões. (O'NEILL, 2014). Portanto, é essencial aproveitar essa enorme diversidade de produção metabólica dos microrganismos para ajudar no desenvolvimento de novos fármacos.

De maneira geral, os antimicrobianos de origem bacteriana e fúngica são derivados do metabolismo secundário desses microrganismos, ou seja, são moléculas que não são necessárias para sua sobrevivência em condições de laboratório, mas proporcionam vantagens em seu ambiente natural (NEWMAN e GRAGG, 2012). Os microrganismos existem na terra há bilhões de anos e apenas em torno de 5% destes microrganismos foram isolados em culturas de laboratórios, no entanto, apenas uma minoria deles foram estudados para produção dos seus metabólitos secundários (AZAM et al., 2014).

Tabela 1 – Linha do tempo da descoberta, introdução e resistência de antibióticos

Antibiótico	Obtenção	Mecanismo	Alvo [†]	Descoberta	Introdução	Resistência
Penicilina	<i>Penicillium</i> sp.	Parede	AE	1928	1938	1945
Prontosil	Sintético	Enzima	GP	1932	1936	1942
Estreptomicina	<i>Streptomyces griseus</i>	Ribossomo	AE	1943	1946	1946
Tetraciclina	<i>Streptomyces</i>	Ribossomo	AE	1944	1952	1950
Cloranfenicol	<i>Streptomyces venequellae</i>	Ribossomo	AE	1946	1948	1950
Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i>	Ribossomo	AE	1948	1951	1955
Fidaxomicina	<i>Dactylosporangium aurantiacum</i>	RNA poli	GP	1948	2011	1977
Vancomicina	<i>Streptococcus orientalis</i>	Parede	GP	1953	1958	1960
Linezolideo	sinte	Ribossomo	GP	1955	200	2001
Rifampicina	<i>S. mediterranei</i>	RNA poli	GP	1957	1958	1962
ciprofloxacina	Sintético	DNA	AE	1961	1968	1968
Estreptomicina B	Semi sintético	Ribossomo	GP	1963	1998	1964
Gentamicina	<i>Micromonospora purpurea</i>	Ribossomo	GN	1963	1971	1967
Boromicina	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Membrana	MB	1967	ND	ND
Fluopsina C	<i>Pseudomonas</i> spp.	Parede	AE	1970	ND	ND
Carbapenem	<i>Streptomyces cattleya</i>	Parede	AE	1976	1985	1993
Daptomicina	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Membrana	GP	1986	2003	1987
Bedaquiline	Sintético	ATPase	MB	1997	2012	2006
Oritavancina	Semissintético	Parede	GP	2001	2014	ND
Dalbavancina	Semissintético	Parede	GP	2007	2014	ND
Telavancina	Semissintético	Parede	GP	2007	2009	ND
Ceftaroline	cephalosporin (<i>prodrug</i>)	Parede	GP	2009	2010	ND
Solithromycin	Ketolido	Ribossomo	AE	2010	2016	ND
Tedizolideo	Semissintético	Ribossomo	GP	2011	2014	ND
Teixobactina	<i>Eleftheria terrae</i>	Parede	GP	2014	ND	ND
Zerbaxa	ceftolozane - tazobactam	Parede	AE	2014	2015	ND
Avycaz	Ceftazidime - avibactam	Parede	GN	2014	2015	ND
Lugdunina	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Ribossomo	GP	2015	ND	ND

[†] AE: Amplo espectro; GP: Gram positivo; GN: Gram Negativo

Dentre os mais diferentes organismos produtores de antimicrobianos, os microrganismos procariotos se destacam pela capacidade de produzir milhares de compostos bioativos (BHANOT; SHARMA; NOOLVI, 2011). Desde a descoberta da penicilina muitos compostos foram caracterizados, a grande maioria produzida por bactérias, principalmente por parte da família Actinomycetaceae (DEMAIN, 2014). Outro exemplo que ilustra este cenário é o gênero *Micromonospora*, do qual já foram isolados cerca de 50 compostos, entre eles a gentamicina, evidenciando a grande diversidade de agentes químicos com múltiplas atividades biológicas e com potencial uso na medicina e no setor agrícola (BOOMI; PRABU; MATHIYARASU, 2014). Também, os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* se destacam como os mais estudados agentes de biocontrole na produção de antibiótico nas últimas décadas. O número total de compostos bioativos conhecidos produzidos por este grupo é de cerca de 3.800, 17% de todos os metabólitos microbianos com atividade antibiótica (BHANOT; SHARMA; NOOLVI, 2011; SIMIONATO et al., 2017).

Em termos competitivos, os microrganismos produtores de antibióticos são favorecidos em relação aos não produtores. Estes compostos trazem vantagem às espécies produtoras e são muito importantes para a sobrevivência, pois mesmo em pequenas concentrações podem inibir o crescimento de outras espécies microbianas, diminuindo a competição por nutrientes (OLIVEIRA et al., 2015). No tópico seguinte será abordada um dos principais condutos (*pipeline*) para a busca, produção, identificação e avaliação de compostos naturais com propriedades antimicrobianas com enfoque principalmente nas técnicas microbiológicas.

3.2 DESENVOLVIMENTO DE ANTIMICROBIANOS NATURAIS

O metabolismo microbiano tem propiciado um grande número de trabalhos com substâncias bioativas que podem ser usadas no controle de doenças, desempenhando funções antibacterianas, antifúngicas, antivirais, entre outras (LEWIS, 2013). A grande maioria dos antimicrobianos naturais provenientes do metabolismo secundário microbiano, são moléculas orgânicas complexas, que requerem um grande número de reações enzimáticas para sua síntese e são geralmente produzidos na fase estacionária depois dos processos celulares associados ao crescimento (BROWN; WRIGHT, 2016)

Na natureza a produção de um determinado antimicrobiano por um determinado microrganismo depende essencialmente da competição por espaço e recursos. Alguns autores têm destacado o papel de produção de certos antimicrobianos em resposta a elicitores de espécies-vizinhas. Em muitos dos casos estas condições são dificilmente reproduzidas dentro do laboratório dificultando a sua obtenção. (HIBBING et al., 2010). No presente, vários especialistas têm apresentado diferentes plataformas para descoberta de novos antibióticos, cada uma delas é defendida pelo seu autor, mas todas têm o mesmo propósito, proporcionar uma solução para à resistência aos antimicrobianos.

Entre as plataformas para novos antibióticos se destacam: triagem molecular, prospecção *in silico*, Rastreamento de alto rendimento (HTS), fatores de virulência, peptídeos antimicrobianos, terapia com fagos, modificação química de velhos antimicrobianos, sínteses de novos pro-medicamentos (prodrugs), imunoterapia e vacinas (LEWIS, 2013; SEIPLE et al., 2016). Este trabalho baseia-se no conduto tradicional de exploração guiada de fenótipos para a descoberta de antimicrobianos, isto inclui a plataforma Waksman a qual está sendo reaplicada pelas novas técnicas de isolamento de microrganismos tanto cultiváveis como “não cultiváveis”. Na próxima sessão serão abordadas todas as etapas para o desenvolvimento de um novo antimicrobiano desde sua busca até os testes em humanos, dividida em três fases: descoberta, pré-clínica e clínica.

3.2.1 Fase de Descoberta

Nesta etapa começa o processo de encontrar novos compostos que poderiam ser candidatos para desenvolver um fármaco. A Pesquisa básica para selecionar estirpes, e a produção, purificação e avaliação da atividade *in vitro* dos seus metabolitos, é o primeiro passo para a descoberta de novos antibióticos. No entanto, nesta fase também se tem a primeira barreira de seleção dos melhores candidatos. De fato, do total de aproximadamente 22.500 antibióticos e compostos bioativos microbianos descobertos, menos de um por cento, apenas cerca de 150 compostos, estão em uso direto na medicina humana, veterinária e/ou agricultura (BÉRDY, 2012)

3.2.1.1 Bioprospecção

A metodologia para localizar, avaliar e explorar sistematicamente a diversidade microbiana existente em um determinado local, tendo como objetivo principal a busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais, é conhecida como bioprospecção (BROWN; WRIGHT, 2016). A bioprospecção microbiológica pode ser dividida em duas categorias dependendo se o microrganismo é cultivável ou não-cultivável.

A bioprospecção de microrganismos cultiváveis envolve o cultivo e a seleção de microrganismos para a aplicação de interesse a partir da biodiversidade microbiana existente em determinado habitat ou armazenada em coleções. É de grande interesse da pesquisa a seleção de microrganismos que cresçam especificamente em determinada fonte de nutrientes. Além disso, o cultivo de microrganismos tem sido melhorado pela ampliação dos conhecimentos de fisiologia, bioquímica e ecologia microbiana por meio do emprego de técnicas de fenotipagem em grande escala, os quais permitem a análise de várias características simultaneamente e facilitam a otimização de meios de cultura (MOREIRA et al., 2015). Um dos métodos ainda usados para seleção de estirpes produtoras de antimicrobianos, é o ensaio de antagonismo que será discutido na seção 0

No caso dos microrganismos não-cultiváveis, microrganismos que não podem ser cultivados com as técnicas atuais de microbiologia, os pesquisadores tem optado principalmente pela utilização da metagenômica e a cultura *in situ* junto com a “domesticação” bacteriana.

Cultura *in situ* e “Domesticação” bacteriana: Bactérias não cultivadas compõem a maioria das espécies no planeta, uma causa comum de "incultivabilidade" é a necessidade de fatores de crescimento produzidos por bactérias vizinhas. Os professores Kim Lewis e Slava Epstein, desenvolveram um método de cultura *in situ*, permitindo o acesso a novos microrganismos do solo e dos ambientes marinhos (KAEBERLEIN; LEWIS; EPSTEIN, 2002). Isto ocorre em uma câmara de difusão colocada no ambiente natural a partir do qual os microrganismos foram amostrados. Os fatores de crescimento do ambiente se difundem na câmara, possibilitando o crescimento. A reinoculação de câmara para câmara produz variantes "domesticadas" capazes de crescer logo em condições de laboratório. A

teixobactina é um exemplo de antimicrobianos produzidos por este método e o primeiro membro de uma nova classe de inibidores da síntese de peptidoglicano (LING et al., 2015). Teixobactina apresenta excelente atividade contra Gram positivos em vários modelos de infecção, e está em desenvolvimento pré-clínico (**Tabela 1**).

Metagenômica: Nesta técnica, o material genético dos microrganismos presentes em determinado ambiente é coletado, isolado e amplificado em bibliotecas de DNA. As bibliotecas metagenômicas permitem não somente a identificação dos principais grupos microbianos presente no ambiente amostrado, como também a caracterização genética (sequência de DNA do pool microbiano) e a prospecção funcional deste. A prospecção destes genomas através de abordagens de genômica comparativa e análises evolutivas, com o auxílio de ferramentas de bioinformática, tem permitido a rápida identificação de novos genes e proteínas com as mais diferentes funções e aplicações. Bibliotecas metagenômicas dos mais distintos ambientes têm sido construídas e informações sobre a microbiota de sistemas complexos como intestino de insetos ou oceanos têm sido efetivamente obtidas e utilizadas para aplicações biotecnológicas (MOREIRA et al., 2015).

A bioprospecção engloba, principalmente, estratégias para exploração da biodiversidade de microrganismos cultiváveis e de não cultiváveis, além de sequências genômicas já disponíveis em banco de dados. Tudo isso tem a finalidade de identificar microrganismos, genes, enzimas e/ou vias metabólicas para posteriores aplicações biotecnológicas de forma estratégica na indústria ou na própria pesquisa. A combinação de diferentes estratégias de bioprospecção para identificação de novos bioprodutos também pode ser empregada. Por exemplo, a bioprospecção *in silico* tem permitido a descoberta de novos genes e vias metabólicas pela análise de sequências genômicas depositadas em banco de dados de organismos não cultiváveis, que podem ser utilizadas para o desenho de sondas moleculares, as quais posteriormente podem ser empregadas em estratégias de prospecção de microrganismos cultiváveis ou não cultiváveis (VARTOUKIAN; PALMER; WADE, 2010; LING et al., 2015; MOREIRA et al., 2015).

3.2.1.2 Produção de antimicrobianos

Fermentação é a técnica de conversão biológica de substratos complexos em compostos simples por organismos tais como bactérias ou fungos, para isto é necessário a criação de um ambiente controlado, uma vez que condições adversas podem resultar na perda parcial ou total da produção do composto bioativo de interesse ou na produção de compostos não desejados. Fermentador ou biorreator é o recipiente aonde ocorre uma fermentação. Ele deve no mínimo ser capaz de garantir uma produção nas condições desejadas, reunindo os regulamentos de contenção locais para uma monocultura e monitorar e controlar, pH, temperatura, pressão, oxigênio, espuma, entre outros (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

O processo de produção é classificado em, Fermentação em Estado Sólido (FSS) e Fermentação Submersa (FSm), com base no tipo de substrato usado pelo microrganismo durante a fermentação (ROBINSON; SINGH; NIGAM, 2001). O desenvolvimento destas técnicas leva à produção de compostos bioativos em altas concentrações sempre e quando sejam encontrados os melhores parâmetros, químicos (substratos, pH e aeração), físicos (Agitação, temperatura, pressão e tempo) e biológicos (inoculo e estirpe), para a fermentação.

Os primeiros métodos de produção basearam-se na utilização da FSm. Nos últimos tempos, o desenvolvimento de substratos adequados levou ao uso generalizado da FSS sobre a FSm (ROBINSON; SINGH; NIGAM, 2001). Estudos têm sugerido que os antibióticos produzidos por FSS são mais estáveis e obtidos em maiores concentrações do que o FSm. Por exemplo, a estirpe IVK28 de *Staphylococcus lugdunensis* produz uma substância antibacteriana apenas sob condições de limitação de ferro e apenas em superfícies sólidas de ágar, não em cultura líquida (ZIPPERER et al., 2016). No entanto, a implementação da FSS é limitada pela qualidade e características do substrato utilizado (ROBINSON; SINGH; NIGAM, 2001).

Assim mesmo, a comparação dos resultados mostra que certas estirpes são mais adequadas para FSS e algumas são mais adequadas para FSm. Portanto, a técnica de fermentação deve ser decidida com base no microrganismo que está sendo usado para a produção (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

Dentro da FSm, as três principais técnicas de fermentação são: descontínua ou por lotes (*batch*), semicontínua ou alimentada (*fed-batch*) e contínua. A maioria

dos processos de fermentação industrial para produção de antibióticos ainda funciona como lote simples ou alimentado, pois produtos não associados ao crescimento microbiano, tais como antibióticos, não são bem produzidos por fermentação contínua (MACAULEY-PATRICK; FINN, 2008).

Sendo que a maioria dos antibióticos são metabólitos secundários, em uma cultura por lotes a fermentação deve ser interrompida na fase estacionária, imediatamente antes das células entrarem na fase de morte (CINAR et al., 2003). No entanto, é preciso estar ciente de que essas definições nem sempre são rígidas na prática real e a formação de produtos de fermentação, como antibióticos e outros Metabólitos secundários é frequentemente observado durante o final da fase de crescimento (MACAULEY-PATRICK e FINN, 2008).

Por sua parte, a fermentação alimentada tornou-se comum principalmente na produção de antimicrobianos. A produção do antibiótico penicilina por *Penicillium chrysogenum* é um exemplo do uso do lote alimentado para produzir um metabolito secundário. O processo de penicilina tem dois estágios, o primeiro é a fase de crescimento estritamente regulada para a obtenção de biomassa, o segundo é a fase de produção ou "idiófase", quando não há crescimento do microrganismo, mas a produção do antibiótico é muito rápida e exclui a produção de outros produtos (WAITES et al., 2001).

É muito importante destacar que, do ponto de vista da engenharia, dependendo do tipo de microrganismo utilizado, as fermentações podem ter características bastante distintas no que se refere aos fenômenos de transporte que ocorrem no bioreator (calor, massa e quantidade de movimento). Neste ponto, a necessidade de melhorar o rendimento e/ou produtividade do processo, dirigiu a pesquisa a otimizar a conversão de substrato em produto.

3.2.1.3 Extração e purificação de antimicrobianos

Ao longo dos anos, vários trabalhos utilizaram diferentes metodologias para extrair e / ou purificar antibióticos, as mais usadas são:

Extração com solvente (ARCAMONE et al., 1969);

Cromatografia

Cromatografia em camada delgada (ECKWALL e SCHOTTEL, 1997)

Cromatografia de exclusão molecular (GALVEZ et al., 1986)
Cromatografia de troca iônica (HOMER et al., 1989)
Cromatografia flash (STANKOVIC, DELFINO e SCHREIBER, 1990)
Cromatografia líquida de alta eficiência (FRANCO e COUTINHO, 1991)
Electroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (GALVEZ et al., 1986)

A maioria destes métodos baseia-se na afinidade dos compostos antibióticos por diferentes solventes de eluição e diferentes matrizes tais como trocadores de íons. A obtenção de um composto puro muitas vezes exige várias etapas de purificação envolvendo diferentes técnicas e cada passo requer julgamento, improvisação e, na maioria dos casos, é necessária uma abordagem de tentativa e erro (DE OLIVEIRA, ET AL., 2015).

Atualmente, o desenvolvimento do LC-MS e LC-MS/MS forneceu novas estratégias para as análises metabolômicas. Uma grande variedade de compostos pode ser analisada usando esta técnica, o que amplia a gama de metabolitos que podem ser estudados. A acoplação do LC com o MS para estudo de metabolitos secundários foi principalmente aproveitada com a invenção da ionização por eletrospray (*electrospray ionization*, ESI), que converte analitos em íons de fase gasosa antes da introdução no analisador de massa. A ESI é uma técnica que gera fragmentos ionizados tanto positivos como negativos, o que aumenta a possibilidade de um composto ser detectado para posteriormente ser caracterizado (ZHANG, 2016)

Deste modo, o isolamento de compostos bioativos exige muita rigorosidade e, na maioria dos casos, requer julgamento, improvisação e inovação dos métodos. A purificação de uma substancia a partir de frações de um extrato pode ser um processo longo e caro. Este é particularmente o caso quando se trata de metabolitos bioativos como os antimicrobianos em que o composto pode estar presente em mínimas quantidades junto com centenas de outros constituintes do extrato (DE OLIVEIRA, 2015).

3.2.1.4 Caracterização molecular

Posteriormente aos processos de bioprospecção, produção, extração e purificação, é possível realizar a caracterização molecular do composto antimicrobiano. Conhecendo a estrutura e os grupos funcionais que a molécula possui, é possível ter uma ideia das suas propriedades físicas, reatividade e deduzir algumas atividades biológicas (SOLOMONS; FRYHLE, 2000). Os métodos espectrométricos são a principal ferramenta para estabelecer a estrutura molecular de um composto e envolvem técnicas espectroscópicas como: Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Infravermelho (IV), Massas (MS), RAMAM, Difração de raios X, entre outras. Os resultados destes ensaios da interação entre a energia e a matéria, fornecem informações detalhadas sobre a estrutura molecular de um composto sendo possível o desenho da molécula (SILVERTEIN ET AL., 2005).

3.2.1.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

Durante os processos de bioprospecção, produção e purificação é importante monitorar a atividade do microrganismo ou dos seus metabolitos. Após ter o composto parcial ou totalmente purificado é necessário realizar testes de susceptibilidade do antimicrobiano contra microrganismos alvos e, paralelamente, podem ser feitos bioensaios para determinar a probabilidade de encontrar microrganismos resistentes ao composto.

3.2.1.6 Testes de monitoramento

3.2.1.6.1 *Confronto direto*

A essência da plataforma de Waksman é que facilita a triagem preliminar dos microrganismos produtores de antibióticos através do desenvolvimento de uma zona clara facilmente visualizada num crescimento confluyente do organismo teste ((SCHATZ; BUGLE; WAKSMAN, 1944).

Método da placa lotada (*The crowded plate method*): é usado para isolar organismos capazes de produzir antibióticos ativos contra outros organismos do solo. Uma suspensão aquosa é plaqueada em ágar de forma a assegurar o desenvolvimento de crescimento confluyente. Alterando os meios de cultura, diferentes grupos de microrganismos podem ser “encorajados” a produzir compostos antimicrobianos (OKAFOR, 1987)

Método de diluição em placa (*Dilution plate method*): O procedimento envolve a mistura de uma amostra de solo diluída plaqueada em um ágar misturado com um microrganismo indicador (pour-plate). Este método é aplicado quando o objetivo é isolar antibióticos contra um organismo ou organismos conhecidos. Baseia-se no princípio de que "a atividade contra uma única espécie / estirpe alvo é um critério suficiente para a seleção de um organismo antagonista" (OKAFOR, 1987)

Uma vez que um microrganismo exibe evidência de ação antibiótica é isolado e novamente confrontado contra outros microrganismos alvos, entre os ensaios mais usados se encontram, o método de **plugue em ágar** (*The agar plug method*), quando o antagonista é um fungo filamentoso, e o método de **estria cruzada** (*The cross streak method*) principalmente para bactérias e leveduras. Em ambos os casos, a estirpe microbiana de interesse é semeada por plugue ou por uma única estria no centro da placa de ágar e logo do período de incubação, a placa é semeada com os microrganismos alvos, a inibição do crescimento confirmará a produção de compostos bioativos (OKAFOR, 1987).

3.2.1.6.1 Testes com sobrenadante ou extratos

Posteriormente ao isolamento do microrganismo antagonista, as estirpes produtoras são crescidas em meio líquido e o sobrenadante é avaliado pelo método de **poço difusão em ágar**. Para isto, um microrganismo alvo é semeado por pour-plate em uma placa de petri e após o ágar solidificar, é perfurado um orifício com um diâmetro entre 6 a 10 mm. Um volume (100 – 200 μL) do sobrenadante filtrado é introduzido no poço. As placas de ágar são incubadas e o agente antimicrobiano difunde no meio de ágar e inibe o crescimento da estirpe microbiana testada (VALGAS et al., 2007).

Já durante o processo de extração e purificação é de grande ajuda usar a técnica de **bioautografia**, a qual combina Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e difusão em ágar. Os microrganismos alvos são semeados por pour-plate dentro de uma placa de petri que contem a lamina de CCD. Depois de algumas horas de incubação aparecem zonas de inibição arredor da fração que contém o composto com atividade antibiótica (MARSTON et al., 2011). Este método é de grande ajuda por fornecer informação valiosa para a futura purificação do composto.

3.2.1.7 Testes pro-clínicos

Denomina-se testes pro-clínicos, aqueles bioensaios que oferecem a possibilidade de estimar a susceptibilidade de um microrganismo à substância isolada. Os testes mais usados, aprovados e padronizados pela CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) são de **disco difusão** e os **métodos de diluição**. O primeiro provê informação qualitativa e categoriza o microrganismo alvo como susceptível, medianamente susceptível ou resistente (CARON, 2012). Neste antibiograma, discos de papel de filtro (cerca de 6mm de diâmetro), contendo o composto de teste com uma concentração conhecida é colocado na superfície do ágar previamente semeado com o microrganismo teste por espalhamento. Depois do período de incubação os diâmetros dos halos de inibição são medidos.

Os métodos de diluição, podem ser usados para a medida quantitativa da atividade antimicrobiana do composto. A **Concentração Inibitória Mínima** (MIC, por sua sigla em inglês) é definida como a menor concentração do antimicrobiano sem crescimento visível do microrganismo testado, e geralmente é dado em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Ambos os métodos também podem ser usados como testes de monitoramento para determinar se há ganho ou perda de atividade (por exemplo, sinergismo) durante o processo de purificação.

3.2.1.8 Testes de resistência ao antimicrobiano

Tanto para os pesquisadores como para as empresas farmacêuticas torna-se cada vez mais importante prever o risco de resistência que podem gerar os microrganismos aos compostos bioativos no processo de desenvolvimento antes de lançar o novo medicamento no mercado. Como resultado, tem-se desenvolvido métodos de avaliação da taxa de resistência *in vitro*, que tentam antecipar a rapidez com que a resistência pode surgir e se espalhar entre os agentes patogênicos. Esta informação não é apenas útil do ponto de vista da saúde pública, mas também para a indústria farmacêutica, a fim de reduzir o potencial desperdício de recursos no desenvolvimento de um composto que pode ser interrompido no curto prazo devido ao desenvolvimento da resistência (ANDERSSON, 2015).

Atualmente, a maioria dos ensaios utilizados são baseados na cultura das bactérias alvo por **única passagem** ou **passagens seriais** na presença de concentrações crescentes de antibióticos. O primeiro método fornece uma medida da concentração de fármaco necessária para evitar a seleção de um mutante pela colocação de um número definido de células ($\sim 10^{10}$) no aumento das concentrações de antibióticos conseguindo determinar as **frequências de mutação** e **Concentração que Prevê Mutantes (MPC, por sua sigla em inglês)** (NAGAI et al., 2000; BLONDEAU, 2009; METZLER; DRLICA; BLONDEAU, 2013).

Por sua vez, experimentos de passagem em série em concentrações progressivamente crescentes do antibiótico avaliam quão rapidamente os mutantes resistentes aparecem e quão alto é possível alcançar um nível de resistência, determinando a concentração que prevê mutantes em relação ao tempo de exposição (DONG et al., 1999; BOGDANOVICH et al., 2005). Embora nenhum dos métodos determine uma taxa de mutação real nem a rapidez com que a resistência pode aparecer, eles fornecem respostas qualitativas que podem ser valiosas para identificar mutações que podem causar resistência (MARTÍNEZ; BAQUERO; ANDERSSON, 2011). No **anexo A** se apresenta um renovado protocolo para avaliar a resistência de possíveis agentes alvos a novos antimicrobianos.

3.2.2 Fase Pré-Clínica

O exame pré-clínico ou não-clínico é o segundo passo no processo de desenvolvimento de drogas. Antes de testar um medicamento em pessoas, os pesquisadores devem descobrir se os compostos mais bem-sucedidos encontrados durante a fase de descoberta têm potencial para causar danos graves (HUGHES et al., 2011). Os testes não-clínicos avaliam os parâmetros de segurança e eficácia dos compostos candidatos a fármacos, através de estudos de toxicidade e de atividade por modelos *In-silico* (simulação computacional); sistemas *in-vitro* (cultura de células); ensaios *ex-vivo* (isolamento de um órgão) e/ou modelos em animais (ANDRADE et al., 2016).

Assim, é nesta fase onde são requeridas pesquisas com células e animais de laboratório para detectar os principais problemas responsáveis pelo insucesso no desenvolvimento do medicamento. A maioria dos protocolos internacionais para a pesquisa pré-clínica estão normatizados pela guia de Boas Práticas de Laboratório (GLP, sigla em Inglês) dos principais órgãos reguladores, o americano (Food and Drug Administration - FDA) e o europeu (European Medicines Agency - EMA), e são adotados por países do mundo inteiro, incluído o Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esses regulamentos estabelecem os requisitos básicos mínimos para garantir a segurança do produto.

Geralmente, os estudos pré-clínicos não são muito amplos. No entanto, esses estudos devem fornecer informações detalhadas sobre os níveis de dosagem e toxicidade (FDA). No Brasil, os estudos não clínicos de segurança propostos pela ANVISA são: estudos de toxicidade de dose única (Aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção – ADME). Todos eles avaliam os efeitos adversos que podem aparecer, principalmente, toxicidade do composto, farmacocinética não favorável, eficácia não comprovada e manifestação de efeitos graves a longo prazo (ANVISA, 2013).

No entanto, é importante ressaltar que, assim como é improvável que sistemas *in vitro* de cito ou genotoxicidade forneçam dados que sejam totalmente equivalentes aos resultados de sistemas *in vivo*, as decorrências dos testes em animais à exposição tóxica não serão totalmente representativas para as

experiências em humanos. Porém, esta segue sendo a única plataforma aceita para estudar os parâmetros ADME no desenvolvimento de novas drogas (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH, 2011, ZHANG et al., 2012, ANDRADE, 2016). A seguir, serão abordados os principais ensaios pré-clínicos para avaliação de novos antimicrobianos prévio aos ensaios clínicos com e sem utilização de animais.

3.2.2.1 Testes pré-clínicos sem uso de animais

Durante a transição da descoberta de fármacos para os testes pré-clínico, perfis toxicológicos relativos ou potenciais já podem ser previstos devido a alertas estruturais ou ao modo de ação do novo composto (HUGHES et al., 2011, ANDRADE, 2016). No entanto, são necessários ensaios com linhas celulares de mamíferos e testes bioquímicos e/ou moleculares para determinar a citotoxicidade e genotoxicidade do composto antimicrobiano alvo em questão. Assim, testes *in vitro* podem detectar danos morfológicos ou genéticos e a viabilidade celular. Entre os principais ensaios se incluem, o **MTT**, um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular, e os testes *do micronúcleo, mutação gênica em células TK de linfoma de camundongo* e o **ensaio "Cometa"**, desenhados para detectar o potencial das substâncias sob investigação de causar mutações gênicas e alterações cromossômicas (ICH, 2011; ANVISA, 2013).

Outros métodos *ex vivo* como tecidos, órgãos ou sistemas celulares podem ser usados para aumentar o conhecimento da toxicocinética do composto antibiótico. Assim mesmo, o HTS (High Throughput Screening) e os modelos *in silico* preveem comportamentos de drogas com base em propriedades físico-químicas de banco de dados dos parâmetros ADME gerados em laboratórios do mundo inteiro. Em consequência, com o uso de todos estes métodos alternativos, pode-se conseguir uma redução, substituição ou refinação do número de animais nas experiências *in vivo* (ZHANG et al., 2012).

3.2.2.2 Testes Pré-clínicos com Animais

Atualmente, novos métodos de modelos com animais alternativos vertebrados (Peixes, anfíbios, répteis e pássaros) e invertebrados como larvas de insetos, representa um marco importante na substituição de testes em roedores (REDE

NACIONAL DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS – REMANA). Um exemplo de hospedeiro para estudos de infecção que está em ascensão é a larva do *Tenebrio molitor* (Coleoptera) (DE SOUZA et al., 2015). Entre as principais vantagens do seu uso, se encontram: *i*) Seu transcriptoma foi publicado (OPPERT ET AL., 2012) e são conhecidos os peptídeos para defesa microbiana que o inseto produz. *ii*) pode ser mantida a temperaturas entre 25 ° C e 37 ° C, o que o torna adequado para o estudo de agentes patogênicos à temperatura corporal (LI et al., 2013). *iii*) o modelo de inoculação do patógeno pode ser realizado por injeção e *iv*) são cultivadas no Brasil e são mais fáceis de reproduzir em laboratório (de SOUZA et al., 2015). Todas estas vantagens tornam o *T. molitor* uma ótima alternativa para realizar ensaios antes do uso de roedores.

No entanto, nenhum dos modelos alternativos mencionados anteriormente substituem totalmente o uso de animais mamíferos (HUGHES et al., 2011; ANDRADE et al., 2016). Os requisitos e características dos diferentes tipos de estudos *in vivo* estão listados na Tabela 2, ali é resumido o guia de orientação estabelecida pela ANVISA para novos medicamentos.

A maioria destes estudos devem ser feitos antes de começar com os estudos clínicos de Fase I, exceto por alguns ensaios como por exemplo os de toxicocinética que podem ser realizados durante as Fases I e II, desde que os ensaios de toxicidade sejam promissores (ANVISA, 2013). Além disso, os testes pré-clínicos não são apenas regulatórios, durante a sua realização existe a oportunidade de descobrir novas potencialidades, corrigir problemas de efeitos colaterais e reduzir a toxicidade do medicamento em estudo. Após dos testes pré-clínicos, são os mesmos pesquisadores que analisam suas descobertas e decidem se o medicamento deve ser ou não testado em humanos (FDA).

3.2.3 Fase Clínica

Com a finalidade de regular o uso de medicamentos por seres humanos, os diferentes países estabeleceram critérios mínimos de segurança para a liberação de uma nova droga no mercado. As agências reguladoras, como a EMEA na Europa, FDA nos Estados Unidos e ANVISA no Brasil, são responsáveis pela elaboração de

normas técnicas e pela avaliação das novas solicitações de uso específico, pela fiscalização e acompanhamento do uso destes medicamentos dentro de suas indicações (GOLDIM, 2007).

Após o antimicrobiano ser aprovado na fase pré-clínica e aceitado pelos respectivos comitês de ética, inicia-se a etapa da pesquisa clínica, realizada em seres humanos, a qual é subdividida em quatro diferentes fases (**Tabela 3**). Estas fases são sucessivas e escalonadas, com níveis crescentes de complexidade e de exposição. Estas fases também se diferenciam pelos objetivos específicos de cada tipo de estudo, pelo tipo de delineamento utilizado e principalmente pelo número e características dos participantes (HULLEY, 2006).

Tabela 2 – Requisitos e características dos diferentes tipos de estudos *in vivo* na fase pré-clínica.

	Objetivo	Modelo Animal	Via de administração	Dosagem	Período de Observação
Toxicidade Aguda	Avaliar a toxicidade	Duas espécies de mamíferos.	Pretendida em humanos e parenteral	≤ 1000 mg/kg/dia	≥ 14 dias
Toxicidade de Doses Repetidas	Caracterizar o perfil toxicológico	Duas espécies de mamíferos (uma não roedora)	Pretendida humanos ou parenteral	≤ 1000 mg/kg/dia x n	2 semanas, ≤ 6 meses, ≥ 6 meses.
Toxicidade Reprodutiva	Revelar efeito na reprodução de mamíferos	Mínimo uma espécie roedora	Pretendida para uso humano	Baseada nos dados de estudos anteriores	Máximo possível
Genotoxicidade	Detectar o potencial de causar mutações gênicas e alterações cromossômicas	Roedores	Preconizadas para uso humano	≤ 2000 mg / kg	Depende do protocolo
Tolerância Local	Avaliar a tolerância local e efeitos mecânicos ou físico-químicos	Mamífero	Oral, ocular, retal, vaginal, cutânea, etc.	Mesma que para humanos	Depende do protocolo
Carcinogenicidade	Identificar desenvolvimento potencial de tumores	Roedores	Pretendida para uso humano	Dose terapêutica	24 meses
Avaliação da Segurança Farmacológica	Pesquisar efeitos farmacodinâmicos indesejáveis	Mamíferos	Pretendida para uso humano	Dose terapêutica	Depende do protocolo
Toxicocinética	Descrever a exposição sistêmica obtida em animais e a sua relação com o nível de dose e o tempo	Roedores	Pretendida para uso humano	Baixa, média e alta	Julgamento científico
Eficácia Antimicrobiana	Avaliar o efeito <i>in vivo</i> da substância antibiótica.	Duas espécies de mamíferos (uma não roedora)	Pretendida humanos e parenteral (sepse)	Baseada nos dados de estudos anteriores	≥ 14 dias

Tabela 3 – Etapas da pesquisa clínica

	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
Denominação	Primeira em Humanos ou Farmacologia humana	Primeira em Pacientes ou Terapia exploratória	Estudo Multicêntrico ou Terapia Confirmatória	Vigilância pós-comercialização ou Uso Terapêutico
Tipo de indivíduos	Voluntários Sadios	Pacientes infectados e controles sadios	Pacientes de Diferentes locais e controles	População em Geral
Número de Indivíduos	20 -100	50 – 1000	> 1000 pacientes > 100 participantes	Ilimitado
Objetivos	Estabelecer uma evolução preliminar da segurança e da tolerabilidade. Determinar características farmacocinéticas e farmacodinâmicas (Dose segura e Dose Máxima). Identificar efeitos adversos.	Estabelecer eficiência e segurança. Determinar parâmetros ADME. Identificar efeitos colaterais.	Confirmar eficácia e segurança. Comparar com outros medicamentos. Monitorar efeitos colaterais (Risco-benefício)	Confirmar eficácia na população em geral. Otimizar o uso do medicamento.
Tempo (acumulado)	< 1 ano	1 -2 anos	3- 5 anos	Ilimitado
Taxa de Sucesso	~50 %	~30	~50%	>80%

Em geral, os estudos clínicos são patrocinados e supervisionados por indústrias farmacêuticas, que tem interesse econômico direto no desenvolvimento do novo medicamento. No caso dos antimicrobianos o custo desde a fase de descoberta até a comercialização do produto se estima que ser superior aos 100 milhões de dólares o que há dificultado o investimento nas pesquisas para este tipo de compostos (ANDRADE et al., 2016). No entanto, é importante reiterar a grande e urgente necessidade de novos compostos antimicrobianos devido a capacidade dos microrganismos para se tornar resistentes aos fármacos, este é um dos desafios da atualidade para os pesquisadores da área.

PERSPECTIVAS

Já há algum tempo, a falta de novos antibacterianos foi amplamente reconhecida como uma grande necessidade médica não atendida. Nessa mesma linha, pode ser utópico pensar na descoberta de um composto antibiótico perene, por isto a busca de novos agentes antibacterianos deve ser contínua e incessante para enfrentar com sucesso a resistência bacteriana

Embora o mecanismo de produção dos antibióticos na natureza não seja bem entendido ainda, não podemos ignorar o fato que são compostos que vêm evoluindo há milhões de anos e dificilmente poderão ser criados no laboratório. Neste contexto, é necessário o desenvolvimento de novas plataformas para o rastreio de inéditas substâncias *in vitro* ou em “biorreatores *ex vitro*” (não reproduzíveis no laboratório), usando técnicas avançadas de bioprospecção (por exemplo HTS). Isto combinado com as estratégias de engenharia metabólica e genética, pode ser também uma alternativa como fonte para encontrar novas moléculas que posteriormente possam ser armazenadas em bases de dados para logo serem estudadas e reproduzidas por técnicas de última geração. Deste modo, estudos das ômicas (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica) permitirá dar uma compreensão dos detalhes moleculares dos agentes produtores, levando à identificação de substâncias com potencial farmacológico.

Sendo assim, é necessário a elaboração de novos modelos para otimização dos compostos e os seus estudos de bioatividade, seletividade e resistência para reduzir o tempo e os custos que são os principais obstáculos para o investimento neste campo. Por outro lado, é conveniente uma regulamentação das novas substâncias antimicrobianas que estabeleçam medidas que assegurem as boas práticas do seu uso, especialmente a sua utilização desmesurada em espécies produtoras de alimentos (bovinos, porcos, avícolas, etc.), a fim de evitar a resistência e preservar sua eficácia no tratamento de infecções em seres humanos.

5 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para a condução de Estudos não clínicos de Toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF**. Brasília, 31 de janeiro de 2013 – v. 2

AMINOV, R. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontier in microbiology**, v.1, p. 1-7, 2010.

ANDERSSON, D. I. Improving predictions of the risk of resistance development against new and old antibiotics. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 10, p. 894–898, 2015.

ANDRADE, E. L., BENTO, A. F., CAVALLI, J., OLIVEIRA, S. K., FREITAS, C. S., MARCON, R., SCHWANKE, R. C., SIQUEIRA, J. M., CALIXTO, J. B. Non-clinical studies required for new drug development - Part I: early *in silico* and *in vitro* studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 11, e5644. Epub October 24, 2016.

ANDRADE, E.L., BENTO, A.F., CAVALLI, J., OLIVEIRA, S.K., SCHWANKE, R.C., SIQUEIRA, J.M., FREITAS, C.S., MARCON, R., & CALIXTO, J.B. Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 12, e5646. Epub December 12, 2016.

ARCAMONE, F., CASSINELLI, G., FANTINI, G., GREIN, A., OREZZI, P., POL, C. AND SPALLA, C. Adriamycin, 14 Hydroxydaunomycin, A New Anti-Tumour Antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, p: 1101 - 1110. 1969.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266–78, 2012.

AZAM A., AHMED A.S., OVES M., KHAN M.S., HABIB S.S., MEMIC A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria: a comparative study. **International journal of medicine**, v.7, p.6003-6009, 2012.

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

BARROS-NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: **editora da unicamp**, 2003.

BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 441–441, 2012.

BHANOT, A.; SHARMA, R.; NOOLVI, M. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. **International journal of Phytomedicine**, v. 3, p. 9–26, 2011.

BLONDEAU, J. M. New concepts in antimicrobial susceptibility testing: The mutant prevention concentration and mutant selection window approach. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5–6, p. 383–396, 2009.

BOGDANOVICH, T., EDNIE, L. M., SHAPIRO, S., APPELBAUM, P. C. Antistaphylococcal activity of ceftobiprole, a new broad-spectrum cephalosporin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, p: 4210–4219, 2005.

BOOMI, P.; PRABU, H. G.; MATHIYARASU, J. Synthesis, characterization and antibacterial activity of polyaniline/Pt-Pd nanocomposite. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 72, p. 18–25, 2014.

BOUCHER, H. W.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S.; EDWARDS, J. E.; GILBERT, D.; RICE, L. B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 48, n. 1, p. 1–12, 2009.

BOX G. E. P., HUNTER, J. S., HUNTER, W. C. *Statistics for Experimenters II*. New York: **John Wiley & Sons**. 2005

BOX, G.E.P.; HUNTER, J.S. *Experimental design for the exploration and exploitation of response surfaces*. CHEW, V. *Experimental design in industry*. New York, **John Wiley & Sons, Inc.**, p.138-190. 1957.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336–343, 2016.

BRUNIERA, F. R.; FERREIRA, F. M.; SAVIOLI, L. R. M.; BACCI, M. R.; FEDER, D.; PEREIRA, E. C.; PEDREIRA, M. L. G.; PETERLINI, M. A. S.; PERAZZO, F. F.; AZZALIS, L. A.; ROSA, P. C. P.; JUNQUEIRA, V. B. C.; SATO, M. A.; FONSECA, F. L. A. Endothelial, renal and hepatic variables in wistar rats treated with vancomycin. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 86, n. 4, p. 1963–1971, 2014.

CARDOZO, V. F.; OLIVEIRA, A. G.; NISHIO, E. K.; PERUGINI, M. R. E.; ANDRADE, C. G. T. J.; SILVEIRA, W. D.; DURÁN, N.; ANDRADE, G.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 12, p. 12, 2013.

CARON, F. Antimicrobial susceptibility testing: a four facets tool for the clinician, **Journal des Anti-Infectieux**, v. 14, p:186-174, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. **Antibiotic / Antimicrobial Resistance**. 2017 (<https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>, Accessed 07 July 2017).

CINAR, A., PARULEKAR, S. J., UNDEY, C., BIROL, G. Batch Fermentation: Modelling, Monitoring and Control. **Chemical Industries Series, Marcel Dekker, Inc., USA**, v. 93, 2003.

DAS, M.; SAKHA GHOSH, P.; MANNA, K. A Review on Platensimycin: A Selective FabF Inhibitor. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2016, p. 1–16, 2016

DE OLIVEIRA, A. G.; MURATE, L. S.; SPAGO, F. R.; LOPES, L. de P.; BERANGER, J. P. de O.; MARTIN, J. A. B. S.; NOGUEIRA, M. A.; MELLO, J. C. P. de; ANDRADE, C. G. T. de J.; ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, v. 56, n. 2, p. 125–131, 2011.

DE OLIVEIRA, A. G.; SPAGO, F. R.; SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O. P.; DA SILVA, C. S.; BARAZETTI, A. R.; CELY, M. V. T.; TISCHER, C. A.; SAN MARTIN, J. A. B.; DE JESUS ANDRADE, C. G. T.; NOVELLO, C. R.; MELLO, J. C. P.; ANDRADE, G. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–12, 2016.

DE SOUZA, P. C.; MOREY, A. T.; CASTANHEIRA, G. M.; BOCATE, K. P.; PANAGIO, L. A.; ITO, F. A.; FURLANETO, M. C.; YAMADA-OGATTA, S. F.; COSTA, I. N.; MORA-MONTES, H. M.; ALMEIDA, R. S. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182–186, 2015.

DEL RIO, L. A.; GORGE, J. L.; OLIVARES, J.; MAYOR, F. Antibiotics from *Pseudomonas reptilivora*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 2, n. 3, p. 189–194, 1972.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 185–201, 2014.

DESBOIS, A. P.; COOTE, P. J. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): An in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1785–1790, 2011.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysate. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 48, n. 3, p. 191–200, 1997.

DONG, Y., ZHAO, X., DOMAGALA, J., DRLICA, K. Effect of fluoroquinolone concentration on selection of resistant mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**; v. 43, p. 1756–1768, 1999.

ECKWALL, E. C., AND SCHOTTEL, J. L. Isolation and Characterization of an Antibiotic Produced by the Scale-Disease-Suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain Pon SSII. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p: 220 – 225, 1997.

EGAWA, Y.; UMINO, K.; YUKIO, I. Tibiotic yc 73 of *Pseudomonas* origin. Ip structure and synthesis of thioformin and its cupric complex (yc 73). **The Journal of Antibiotics**, p. 225–226, 1971.

FAIR, R. J., TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the XXI century. Perspectives. **Medical Chemical**, v. 6, p. 25–64, 2014.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 9, p. 1333–1341, 2005.

FIRSOV, A. A.; GOLIKOVA, M. V.; STRUKOVA, E. N.; PORTNOY, Y. A.; ROMANOV, A. V.; EDELSTEIN, M. V.; ZINNER, S. H. In vitro resistance studies with bacteria that exhibit low mutation frequencies: Prediction of “antimutant” linezolid concentrations using a mixed inoculum containing both susceptible and resistant *staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1014–1019, 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). The Drug Development Process. <https://www.fda.gov/ForPatients/Approvals/Drugs/default.htm>. Access, June 12, 2017.

FRANCO, C. M. M., COUTINHO, L. E. L. Detection of Novel Secondary Metabolites. Critical. **Reviews in Biotechnology**, v. 11, p: 193 – 276, 1991.

FRIEDMAN, N. D., TEMKIN, E., CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 416-422, 2016.

GALVEZ, A., MAQUEDA, M., VALDIVIA, E., QUESADA, A., MONTOYA, E. Characterization and Partial Purification of Broad Spectrum Antibiotic A5 - A8 Produced by *Streptococcus faecalis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 32, p: 765 -771, 1986.

GOLDIM, J. R. A avaliação ética da investigação científica de novas drogas: a importância da caracterização adequada das fases da pesquisa. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 27, n. 1, p. 66–73, 2007.

HEDMAN, R.; LEVENFORS, J.; STANISLAW, P.; WELCH, C. F.; DAUGHERTY, S.; LARSSON, R. L.; GULLBO, J.; GERHARDSON, B. Use of a known substance for the treatment of cancer and bacterial and fungal infections. **Google Patents**, 2004

HIBBING, M. E., FUQUA, C., PARSEK, M. R., PETERSON, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p:15–25, 2010.

HOLMES, A. H., MOORE, L. S., SUNDSFJORD, A., STEINBAKK, M., REGMI, S., KARKEY, A., GUERIN, P.J., PIDDOCK, L.J. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 387, n. 10014, p. 176-187, 2015.

HOMER, T., ZAHNER, H., KELLNER, R., AND JUNG, G. Fermentation and Isolation of Epidermin, a Lanthonine Containing Polypeptide Antibiotic from *Staphylococcus epidermidis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p: 219 - 225. 1989.

HUGHES, J. P.; REES, S.; KALINDJIAN, S. B.; PHILPOTT, K. L. Principles of early drug discovery. **British journal of pharmacology**, v.162, p: 1239–1249, 2011.

HULLEY, S. B., CUMMINGS, S. R., BROWNER, W. S., GRADY, D., HEARST, N., NEWMAN, T. B. **Delineando a Pesquisa Clínica**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). ICH S2 (R1) Guidance on Genotoxic Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use, 2011.

ITOH, S.; INUZUKA, K.; SUZUKI, T. New antibiotics produced by bacteria grown on n-paraffin (mixture of C12, C 13 and C14 fractions). **The Journal of Antibiotics**, v. 23, p. 542–545, 1970.

KAEBERLEIN, T.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S. S. Isolating “Uncultivable” Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural. **Environment. Science**, v. 296, n. 5570, p. 1127–1129, 2002

KERBAUY, G., VIVAN, A. C. P., SIMÕES, G. C., SIMIONATO, A. S., PELISSON, M., VESPERO, E. C., COSTA, S. F., ANDRADE, C. G. T. J., BARBIERI, D. M., MELLO, J. C. P., MOREY, A. T., YAMAUCHI, L. M., YAMADA-OGATTA, S. F., de OLIVEIRA, A. G., ANDRADE, G. Effect of metalloantibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) – producing *K. pneumoniae*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 389-397, 2016.

KUMAR, P. S.; DURAIANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 30, n. 9, p. 435–446, 2014.

LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K. M.; WERTHEIM, H. F. L.; SUMPRADIT, N.; Vlieghe, E.; HARA, G. L.; GOULD, I. M.; GOOSSENS, H.; GREKO, C.; SO, A. D.; BIGDELI, M.; TOMSON, G.; WOODHOUSE, W.; OMBAKA, E.; PERALTA, A. Q.; QAMAR, F. N.; MIR, F.; KARIUKI, S.; BHUTTA, Z. A.; COATES, A.; BERGSTROM, R.; WRIGHT, G. D.; BROWN, E. D.; CARS, O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057–1098, 2013.

LEMIRE J. A., HARRISON J. J., TURNER R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, p.371-384, 2013.

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 5, p. 371–87, 2013.

LI, D.-D., DENG, L., HU, G.-H., ZHAO, L.-X., HU, D.-D., JIANG, Y.-Y., WANG, Y. Using *Galleria mellonella*–*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. **Biological and Pharmacological Bulletin**, v 36, p: 1482–1487. 2013.

LIN, T. H.; PAN, T. M. Optimization of antimicrobial substances produced from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 (DSM 28047) and *Lactobacillus plantarum* NTU 102 by response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 6010–6016, 2015.

LING, L. L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A. J.; SPOERING, A. L.; ENGELS, I.; CONLON, B. P.; MUELLER, A.; HUGHES, D. E.; EPSTEIN, S.; JONES, M.; LAZARIDES, L.; STEADMAN, V. a; COHEN, D. R.; FELIX, C. R.; FETTERMAN, K. A.; MILLETT, W. P.; NITTI, A. G.; ZULLO, A. M.; CHEN, C.; LEWIS, K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 455–459, 2015.

LIVERMORE, D.M. British Society for Antimicrobial chemotherapy working party on the urgent need: regenerating antibacterial drug discovery and development. discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p:1941-1944, 2011.

LUTHER, M. K.; ARVANITIS, M.; MYLONAKIS, E.; LAPLANTE, K. L. Activity of daptomycin or linezolid in combination with rifampin or gentamicin against biofilm-forming *Enterococcus faecalis* or *E. faecium* in an in vitro pharmacodynamic model using simulated endocardial vegetations and an in vivo survival assay using Gal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4612–4620, 2014.

MACAULEY-PATRICK, S., FINN, B. Modes of Fermenter Operation, in Practical Fermentation Technology (eds B. McNeil and L. M. Harvey), **John Wiley & Sons, Ltd**, Chichester, UK, Ch.4, p: 69-95, 2008.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MARSTON, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. **Journal Chromatography**, v. A1218, p: 2676–2683, 2011.

MARTÍNEZ, J. L.; BAQUERO, F.; ANDERSSON, D. I. Beyond serial passages: New methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, n. 5, p. 439–445, 2011.

METZLER, K.; DRLICA, K.; BLONDEAU, J. M. Minimal inhibitory and mutant prevention concentrations of azithromycin, clarithromycin and erythromycin for clinical isolates of *streptococcus pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 3, p. 631–635, 2013.

MOREIRA, J. C., GARCIA, D., DIAS, P. F. Bioprospecção Microbiana. **EMBRAPA**. 2015.

MOREIRA, W.; AZIZ, D. B.; DICK, T. Boromycin kills mycobacterial persisters without detectable resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–7, 2016.

MUNHOZ, L. D.; FONTEQUE, J. P.; SANTOS, I. M. O.; NAVARRO, M. O. P.; SIMIONATO, A. S.; GOYA, E. T.; REZENDE, M. I.; BALBI-PEA, M. Isabel; DE OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, G. Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Cogent Food & Agriculture**, v. 3, n. 1, p. 1–16, 2017.

MURATE, L. S.; OLIVEIRA, A. G. De; HIGASHI, A. Y.; BARAZETTI, A. R.; SIMIONATO, A. S.; SANTOS, C.; SIMÕES, G. C.; MATHEUS, I.; FERREIRA, M. R.; VIVIANA, M.; CELY, T.; OCTAVIO, M.; NAVARRO, P.; FREITAS, V. F. De; NOGUEIRA, M. A.; CARLOS, J.; MELLO, P. De; PEREIRA, R.; JR, L. Activity of Secondary Bacterial Metabolites in the Control of Citrus Canker. **Agriculture Science**, n. March, p. 295–303, 2015.

MYERS, R.H & MONTGOMERY, D.C. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. Canada, **John Wiley & sons, Inc.** 1995

NAGAI, K.; DAVIES, T. A.; PANKUCH, G. A.; DEWASSE, B. E.; JACOBS, M. R.; APPELBAUM, P. C. In vitro selection of resistance to clinafloxacin, ciprofloxacin, and trovafloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2740–2746, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations – The Review on Antimicrobial Resistance. **Review on Antimicrobial Resistance**, p. 1-20, dezembro, 2014.

OKAFOR, N. Antibiotics and Anti - Tumour Agents. In: Industrial Microbiology. **University of UK Press Ltd.** p: 336 – 369, 1987.

OLIVEIRA, A. G., SIMIONATO, A. S., NAVARRO, M. P., ANDRADE, G. Antimicrobianos Naturais Produzidos por Microrganismos: da busca à identificação. Em: Tópicos especiais de microbiologia. **Universidade Estadual de Londrina**. Cap. 12, p:180-199, 2015.

OPPERT, B., DOWD, S. E., BOUFFARD, P., LI, L., CONESA, A., LORENZEN, M. D., TOUTGES, M., MARSHALL, J., HUESTIS, D. L., FABRICK, J., OPPERT, C.,

JURAT-FUENTES, J. L. Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin. **PLoS One**, v. 7, e 34624. 2012

OTSUKA, H.; NIWAYAMA, S.; TANAKA, H.; TAKE, T.; UCHIYAMA, T. An antitumor antibiotic, no. 4601 from *Streptomyces*, identical with YC 73 of *Pseudomonas origin*. **The Journal of antibiotics**, v. 25, n. 6, p. 369–370, 1972. p:228-234, 2014.

PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. Oxford: **Oxford University Press**, 6ed, ch.19, 2017.

REDE NACIONAL DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS (REMANA). **Ministério de ciência e tecnologia** – Brasil. <http://renama.org.br/>. Access, Junho 13, 2017.

RICE, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079–1081, 2008.

RICHARD, W. The urgent need for new antibacterial agents. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**; v. 66, p: 1939–1940, 2011.

ROBERTS, R. R.; HOTA, B.; AHMAD, I.; SCOTT, R. D.; FOSTER, S. D.; ABBASI, F.; SCHABOWSKI, S.; KAMPE, L. M.; CIAVARELLA, G. G.; SUPINO, M.; NAPLES, J.; CORDELL, R.; LEVY, S. B.; WEINSTEIN, R. a. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship. *Clinical infectious diseases* : an official publication of **the Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 8, p. 1175–84, 2009.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: A promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 284–289, 2001.

ROSSOUW, J. E.; SAUNDERS, S. J. Hepatic Complications of Antituberculous Therapy. *QJM: An International Journal of Medicine*, v. 44, n. 1, p. 1–16, 1 jan. 1975.

SANTAJIT, S., INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed research international**, v 2016, p: 2475067, 2016.

SARAVANA KUMAR, P., DURAI PANDIYAN, V., IGNACIMUTHU, S. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. **Kaohsiung Journal Medical Science**; v. 30, n. 9, p: 435-446, 2014

SCHATZ, A., BUGIE, E., WAKSMAN, S. A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 55, p: 66–69, 1944.

SEIPLE, I. B.; ZHANG, Z.; JAKUBEC, P.; LANGLOIS-MERCIER, A.; WRIGHT, P. M.; HOG, D. T.; YABU, K.; ALLU, S. R.; FUKUZAKI, T.; CARLSEN, P. N.; KITAMURA, Y.; ZHOU, X.; CONDAKES, M. L.; SZCZYPIŃSKI, F. T.; GREEN, W. D.; MYERS, A. G. A platform for the discovery of new macrolide antibiotics. **Nature**, v. 533, n. 7603, p. 338–345, 2016.

SILVERTEIN R.M., WEBSTER F., KIEMLE D. Spectrometric Identification of Organic Compounds. Estados Unidos: **Wiley**, 7 ed, 2005.

SIMIONATO, A. S.; NAVARRO, M. O. P.; DE JESUS, M. L. A.; BARAZETTI, A. R.; DA SILVA, C. S.; SIMÕES, G. C.; BALBI-PEÑA, M. I.; DE MELLO, J. C. P.; PANAGIO, L. A.; DE ALMEIDA, R. S. C.; ANDRADE, G.; DE OLIVEIRA, A. G. The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–9, 2017.

SOLOMONS T. W. G., FRYHLE C. B. Química Orgânica. 7ª edição. Rio de Janeiro: LTC editora, 2000. v.1

SPAGO, F. R., ISHII-MAURO, C. S., de OLIVEIRA, A. G., BERANGER, J. P. O., CELY, M. V. T., STANGANELLI, M. M., SIMIONATO, A. S., SAN MARTIN, J. A. B., ANDRADE, C. G. T. J., MELLO, J. C. P., ANDRADE, G. *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas species*. **Crop Protection**, v. 62, p. 46-54, 2014.

SPELLBERG, B. The future of antibiotics. **Critical Care**, v. 18, p. 228, 2014

SPELLBERG, B.; GILBERT, D. N. The future of antibiotics and resistance: A tribute to a career of leadership by John Bartlett. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. Suppl 2, p. S71–S75, 2014.

STANKOVIC, C. L., DELFINO, J. M., SCHREIBER, S. L. Purification of Gramicidin A. **Analytical Biochemistry**, v. 184, p: 100 - 103. 1990.

STRINGER, T.; SELDON, R.; LIU, N.; WARNER, D. F.; TAM, C.; CHENG, L. W.; LAND, K. M.; SMITH, P. J.; CHIBALE, K.; SMITH, G. S. Antimicrobial activity of organometallic isonicotinyl and pyrazinyl ferrocenyl-derived complexes. **Dalton Trans.**, 2017.

STRUKOVA, E. N.; PORTNOY, Y. A.; ZINNER, S. H.; FIRSOV, A. A. Species differences in ciprofloxacin resistance among Gram-negative bacteria: can anti-mutant ratios of the area under the concentration time curve to the MIC be achieved clinically **Journal of Chemotherapy**, v. 9478, n. July, p. 1–7, 2017.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances : a Comparative Study. **Intenational Journal of Science and Nature**, v. 3, n. 3, p. 480–486, 2012.

TOLEDO, P. V. M.; ARANHA, A. A.; AREND, L. N.; RIBEIRO, V.; ZAVASCKI, A. P.; TUON, F. F. Activity of antimicrobial combinations against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a rat model and time-kill assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4301–4304, 2015.

- TOLEDO, P. V. M.; TUON, F. F.; BAIL, L.; MANENTE, F.; ARRUDA, P.; ARANHA-JUNIOR, A. A. Modelo Experimental De Tratamento De Sepse Por *Klebsiella Pneumoniae* Produtora De Betalactamase De Amplo Espectro. **Arq Bras Cir Dig**, v. 27, n. 3, p. 168–171, 2014.
- VALGAS, C., DESOUZA, S. M., SMÂNIA, E. F. A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, **Brazilian Journal in Microbiology**, v. 38, p: 369–380. 2007
- VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. Strategies for culture of “unculturable” bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 309, n. 1, p. 1–7, 2010.
- VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T : A peer-reviewed journal for formulary management** (2015), v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015.
- WAITES, M. J., MORGAN, N. L., ROCKEY, J. S., HIGTON, G. In *Industrial Microbiology: An Introduction*. Blackwell Science, **Oxford**, p. 103. 2001
- WANG, Y., YAN, A., HUANG, X.Q., ZHANG, X.H., XU, Y.Q. Construction of *Pseudomonas* sp. M18 qscR–Mutant and its regulation on biosynthesis of PCA and Plt **Acta Microbiology Singapore**, v. 47, p: 254-259. 2007
- WATKINS, R. R., BONOMO, R. A. Overview: Global and local impact of antibiotic resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, p. 313-322, 2016.
- WISE, R. The urgent need for new antibacterial agents. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 1939–40, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Antimicrobial Resistance. **Global Report on Surveillance. Library Cataloguing-in-Publication Data**. 2014
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Handbook good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated nonclinical research and development. <http://www.who.int/tdr/publications/documents/glp-handbook.pdf>. Accessed June 17, 2017.
- YU, G.; BAEDER, D.; REGOES, R.; ROLFF, J. Predicting Drug Resistance Evolution: Antimicrobial Peptides Vs. Antibiotics. **bioRxiv**, p. 1–24, 2017.
- YUAN, L., LI, Y., WANG, Y., ZHANG, X., XU, Y. Optimization of critical medium components using response surface methodology for phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas* sp. M-18Q. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.105, p: 232–237, 2008.
- ZHANG, C. Liquid chromatography-mass spectrometry based drug monitoring and metabolomics for biomarker discovery: Application in complementary treatments of COPD. **Michigan State University**, Dissertation, 176 pages, 2016.
- ZHANGA, D., LUOB, G., DINGC, X., LU, C. Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development 2012 **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 6, p: 549–561, 2012.

ZIPPERER, A., KONNERTH, M., LAUX, C., BERSCHIED, A., JANEK, D., WEIDENMAIER, C., BURIAN, M., SCHILLING, N. A., SLAVETINSKY, C., MARSCHAL, M., WILLMANN, M., KALBACHER, H., SCHITTEK, B., BRÖTZ-OESTERHELT, H., GROND, S., PESCHEL, A., KRISMER, B. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. **Nature**, v. 28; n. 535 (7613), p: 511-516. 2016.

ANEXO A

Um modificado protocolo para determinar o risco de resistência de multi-patógenos contra compostos antibióticos

Apresenta-se um método para estudos de seleção de mutantes resistentes. Com a sua aplicação pode se ter melhores argumentos para prever a resistência de um microrganismo contra um composto antibiótico. O protocolo combina as técnicas de múltipla e única passagem e a metodologia de concentração que prevê mutantes (MPC) (**Figura A1**). Além disso, o método é feito por microdiluição em placas de 96 poços o que possibilita a avaliação de diferentes agentes patogênicos com pouco gasto do composto antibiótico.

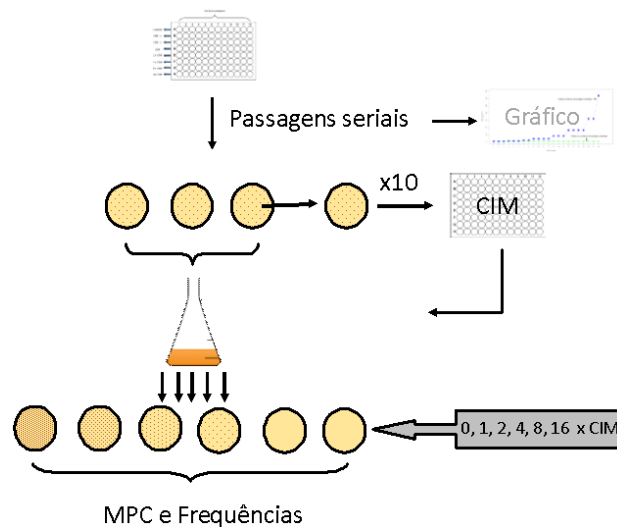


Figura A1 – Esquema geral do protocolo para determinação do risco de mutantes resistentes a novos compostos bioativos.

1. Um inóculo inicial de 10^8 UFC.mL⁻¹ de cada estirpe alvo é preparado a partir de uma placa de cultura crescida overnight.
2. Microplacas de 96 poços são organizadas como se apresenta na **Figura A2**. Na primeira fileira (fileira A) são colocados 100 µL de Caldo de cultivo sem o antibiótico (controle) e nas demais fileira se colocam 100 µL do caldo com diferentes concentrações de antibiótico: fileiras B e C com diluições dobradas abaixo da MIC (0,25 e 0.5 x MIC), na fileira D a MIC e nas fileiras E, F, G e H, diluições dobradas acima da MIC (2, 4, 8 e 16 x MIC).

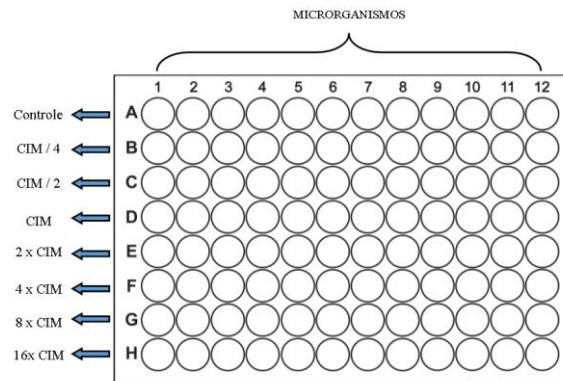


Figura A2 – Arranjo da microplaca de 96 poços. Cada coluna é inoculada com um microrganismo diferente (até 12 estirpes), em quanto as filas tem concentrações crescentes do composto antimicrobiano.

3. Colocar 1 μ L em todas as colunas do inoculo de cada microrganismo. Até 12 estirpes diferentes podem ser testadas. No entanto, se aconselha fazer com replica biológica, no caso de acontecer uma contaminação.
4. Após período de incubação (35°C por 24h), transferir 1 μ L do poço suplementado com a maior concentração do antibiótico que apresentava crescimento (a mesma turbidez do controle) a uma nova placa com meio fresco (igual à anterior), tendo em conta que o poço adjacente sem crescimento será a nova MIC.
5. Realizar este mesmo procedimento diariamente (recomenda-se pelo menos 3 semanas de passes seriais).
 - a. **Observação:** Recomenda-se fazer repiques periodicamente em placa para conferir se não houve contaminação cruzada ou mesmo externa.
6. Realizar um gráfico de linhas apresentando o incremento da MIC no tempo como no exemplo da **Figura A3**.
 - a. **Observação:** Com o fim de evitar gastos desnecessários do composto, para os microrganismos que não apresentam incremento significativo na MIC (<4x), não são necessários os passos a seguir.

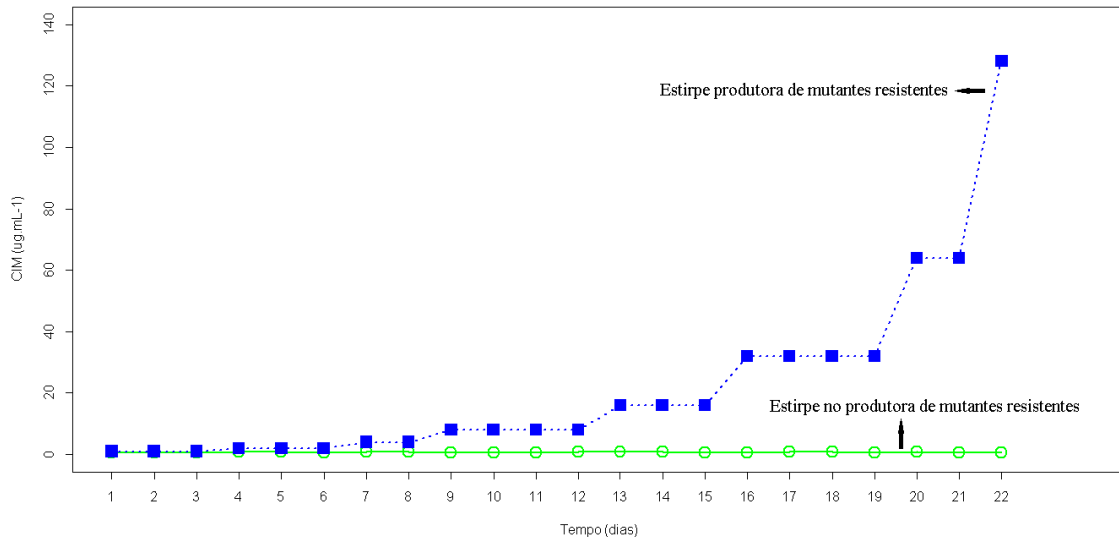


Figura A3 – Exemplo de gráfico de linhas, apresentando duas estirpes diferentes e seu potencial para gerar mutantes resistentes ao novo composto bioativo.

7. Após o tempo das múltiplas passagens, os microrganismos dos poços com crescimento na maior concentração do antibiótico (clones resistentes) são semeados em 3 placas com ágar livre do antibiótico e incubadas. Os poços adjacentes sem crescimento, são avaliados para concentração bactericida mínima (MBC).

8. Após incubação, uma colônia é usada para realizar múltiplas passagem em placas com ágar sem antibiótico. Subsequentemente das transferências bacterianas por 10 dias, colônias são escolhidas aleatoriamente e sua MIC e MBC são novamente determinadas pelo método padronizado pela CLSI. Fazer repique em 3 novas placas e realizar os mesmos procedimentos a seguir.

9. Todas as células bacterianas das 3 placas restantes (Paso viii) são transferidas para 100 mL de CMH e incubadas durante 18h.

10. As células da cultura são concentradas por centrifugação a 5000 rpm durante 20 min a 4°C. O sedimento celular é reconstituído em 3 mL de solução salina e a concentração de células é determinada pela escala de Mcfarland.

11. 100 µL de cada suspensão são inoculadas nas placas com concentrações de 0 até 32 x MIC. Incubar.

12. Após incubação, verificar a presença ou ausência de crescimento bacteriano em 72h e fazer contagem das colônias em cada uma das placas. A frequência de mutação é determinada relacionando o número médio de UFC que crescem em

placas suplementadas com o antibiótico, comparadas com o número médio de UFC obtidas na ausência do antibiótico. De tal modo, pode ser feito um gráfico comparando o número de células pela concentração de antibiótico (**Figura A4**).

13. Finalmente, determinar a concentração mais baixa de antibiótico que evitou o crescimento dos organismos alvos, está será a concentração que prevê mutantes resistentes (**Figura A4**).

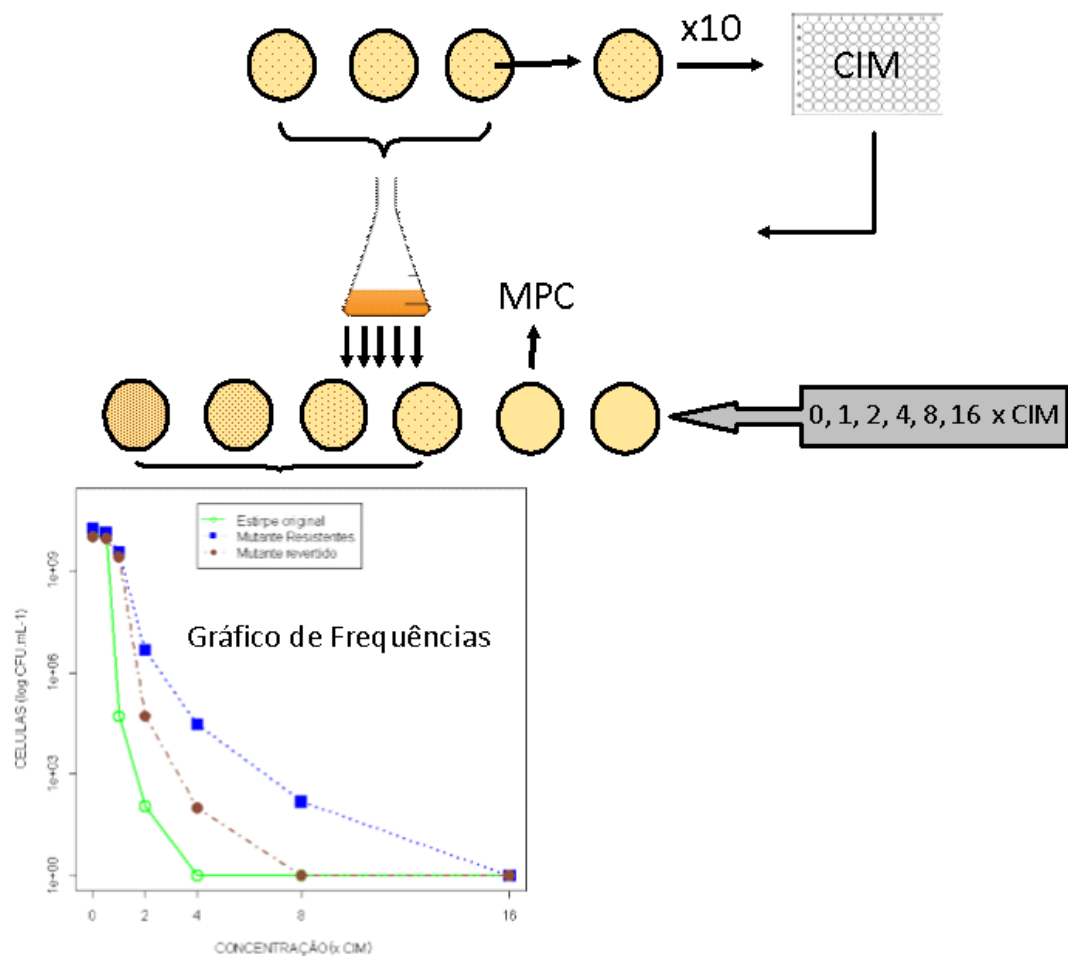


Figura A4 – Determinação de frequências e concentração que prevê mutantes (MPC) para todas as estirpes, original, mutantes resistentes e mutante revertida.

14. Análises: Além dos gráficos de aquisição de resistência durante as passagens seriais e das frequências, é possível realizar um quadro que apresente todas as variações para cada uma das estirpes (**Quadro A1**):

Quadro A1 – Tabulação de dados obtidos durante os ensaios com as diferentes estirpes e seus mutantes resistentes.

Parâmetro	Estirpe Silvestre	Mutante	Mutante Revertida
MIC			
MBC			
PMC			
Frequências			

Com estes valores o pesquisador poderá ter um maior critério sob a efetividade clínica que terá o antibiótico num primeiro momento (com a cepa silvestre) e num futuro quando se desenvolvam mutantes ao antibiótico em questão. Portanto, as frequências de mutação e a concentração que prevê mutantes são dados mais acertados do que pode acontecer na prática, possibilitando inferir sob o risco de desenvolvimento de resistência do composto antibiótico.

ARTIGO I

Journal: Frontiers in Microbiology

Research Topic: Alternative Therapeutics Against Antimicrobial-Resistant Pathogens

Article Type: Methods

Impact factor: 4.076

Author Guidelines in:

<http://journal.frontiersin.org/journal/microbiology/section/antimicrobials-resistance-and-chemotherapy#author-guidelines>

ACTIVITY AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT CLINICAL STRAINS AND PREDICTIONS OF THE RISK OF RESISTANCE DEVELOPMENT TO ORGANOCOPPER ANTIMICROBIAL COMPOUND

Miguel Octavio Pérez Navarro, Galdino Andrade,^{1*}

¹Laboratório de Ecologia Microbiana, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR 86057-970, Brazil

*Corresponding authors: Galdino Andrade, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. CEP 86051-990, Londrina, Brazil gal.andrade7@gmail.com

Keywords: Antibiotic, Fluopsin C, Electronic microscopy, multidrug resistance (MDR), Minimal Inhibition/Bactericide Concentration (MIC/MBC), mutant prevention concentration (MPC), single and serial passages.

Abstract

The emergence of infections caused by antibiotic-resistant bacteria increasing and the risk of resistance development of new antibiotics candidates must be correctly evaluated. Methods to evaluate spontaneous resistant mutant (RM) had been established but estimate ambiguously the frequency and speed of mutants arise. The real RM rate using many pathogens against a bioactive molecule is necessary to reduce the potential waste of resources in the development of novel antimicrobial products. Organocopper Antimicrobial Compound (OAC) produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain was tested by a renovate method of resistance risk assessment where frequencies and Mutant Prevention Concentration (MPC) were calculated. Previously, the correlation between copper concentration, time and OAC production

in submerged batch culture was evaluated. The extracellular compounds OAC were purified by liquid chromatography. Parent strains and OAC-RMs selected after the 21st passage on antibiotic-containing media was chosen to determine the bactericide activity and the resistance risk against four clinical pathogens multidrug resistance (MDR). The OAC bioactivity was observed for electronic microscopy. The results show enhanced in the OAC obtaining, culture medium between 25 and 50 mg.L⁻¹ CuCl₂.2H₂O increased the production of OAC by up to 15 fold. OAC had high antibiotic activity against all strains MDR tested with MIC's and MBC's ≤ 2 µg mL⁻¹. OAC-RM21 bacteria had MPC between ≤ 4 x MIC. Electron microscopy showed that OAC altered the exopolysaccharide matrix and caused disruption of the cell wall of the pathogen. This method improved the prediction of the risk of resistance development of new antimicrobial and the results suggest that OAC have high potential bioactive and low mutant frequency.

Introduction

Currently, the need for new antibiotic discovery are as important as finding the probability of developing resistance. Due to the exacerbated use of antimicrobials, the rapid emergence of resistant bacteria have caused a global public health crisis, imperilling the efficacy of antibiotics. The antimicrobial resistance (AMR), which includes multidrug resistance (MDR), is the main challenge in view of the low treatment success rates and high cause of death worldwide (Ventola, 2015). Vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and Carbapenem-resistant Enterobacteria (CRE), among them the bacteria producing the enzyme *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) are among the most common etiological agents strains associate with greatest risk for health services due to its increasing rates of antibiotic resistance (Arias and Murray, 2012; Boucher et al., 2009).

Consequently, is very important to predict the resistance risk that microorganisms can acquire to a bioactive compound during antibiotic development research. Methods to evaluate *in vitro* resistance had been established. They allow to estimate the frequency (single pass), speed of emergence (serial pass) and Mutant Prevention Concentration (MPC) (Dong et al., 1999; Nagai et al., 2000). However, this assays carried out separately provide answers that may be ambiguous to identified resistance mutations and that are highly dependent on the starting inoculum that might not contain spontaneously resistant mutants (RMs) (Firsov et al., 2015; Martínez et al., 2011). Therefore, is necessary to determinate a real rate of mutant risk, this information is significant for both public health and pharmaceutical industry, in order to reduce the potential waste of resources in the development of a compound that can be disrupted in the short term due to the development of resistance (Andersson, 2015). Likewise, is essential to perform tested in many pathogens and their RMs clones for have a better idea of the factual risk of mutant arise to the new products.

Extract with antibiotic activity obtained from a culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain LV, were evaluated against a variety of pathogens and promising results were obtained (Cardozo et al., 2013; de Oliveira et al., 2011; De Oliveira et al., 2016; Kerbauy et al., 2016; Munhoz et al., 2017; Murate et al., 2015). Some of these bioactive compounds has been classified as an organocopper antimicrobial

compound (OAC) substance with high antimicrobial activity which is produced in the presence of copper salts in the culture medium. Was necessary to evaluate bioactivity and resistance risk of the pure OAC against different clinical pathogens to estimate if this antibiotic have potential to clinical use. Therefore, the aims in this study were: *i*) To optimized the $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ concentration in the medium and the fermentation time on the production of OAC, *ii*) to evaluate the bioactivity of pure OAC produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain LV on MDR and, *iii*) to perform resistance risk studies, proposing a new protocol to new antibiotic compounds.

Materials and methods

Microorganisms

The OAC is produced by *Pseudomona aeruginosa* (strain LV) isolated from a citrus canker lesion on a fruit of orange plants (*Citrus sinencis* cv.Valence) at Astorga, PR, Brazil (Rampazo, 2004). The strain *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri strain 306 (Xac 306) was used as supernatant activity indicator. The pathogens *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 and *Enterococcus faecium* ATCC 6569 were used as a non-resistance strain. The strains SARM N315 and SARM BEC9393 and the clinical isolated VRE 170 and CRE-*Kpn 19* strains were transferred from the collection of microorganisms from the Microbiology Laboratory of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. All bacterial strains were stored at -20°C and in liquid nitrogen. The bacterial strains were deposited in the Microbial Culture Collection of the Microbial Ecology Laboratory, Londrina State University, Brazil.

Copper Chloride Effect in OAC Production

The culture parameters and the process of OAC producing is based on the patent deposited (Patent PI0803350-1 - INPI 09/12/20092008; [Http://www.inpi.gov.br](http://www.inpi.gov.br)). Studies carried out to increase the production of molecules with antibiotic activity. For this, the quantification and the production of the antibiotic compound in cultures submerged in Nalgene gallons with capacity of 10 L with 5 L of nutrient broth (NB) with concentrations of 0, 5, 10, 15, 25, 50, 100, 150 and 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and pH of 6.8. The media were inoculated with 0.1% *P. aeruginosa* [10^8 CFU.mL⁻¹] and kept under a constant aeration system to 1 bar and 28°C for up to 12 days. One sample of 500 mL of each gallon were taken to 1, 4, 8 and 12 days of production. A 1 ml aliquot was taken to perform the well-diffusion test on agar, and the remaining supernatant was extracted, purified and quantified. The experiments were done with biological replicates in different period.

Extraction, Purification and Quantification of OAC

The extraction of the fraction with antibiotic activity was performed as described by Oliveira et al., (2016). The bacterial culture was centrifuged (20 min at 4°C , 9.000 rpm) and the supernatant was concentrated on a rotary evaporator (R 215, Büchi®) under the vacuum system of -80 KPa at 60°C until at least 95%. Aliquots of the cell-free concentrated supernatant were treated five time with dichloromethane 1:2 (v:v), After the dichloromethane phases (DP) were concentrated into vacuum system, weighed and fractioned by chromatography techniques.

A Flash Chromatography was run on a glass column (350 mm long with 20 mm diameter) containing 30 g silica gel 60 (0.04-0.062 mm, Macherey-Nagel) coupled to a low-pressure pump. Aliquots of 0.25 g of DP mixed with 0.1 g of silica gel 60 were fractionated using 500 ml of the mobile phase: Petroleum ether: dichloromethane: Ethyl Ether (65:25:10). The fourth fraction obtained in this phase was denominated CF4. To purify and quantify OAC production, a semi-preparative Agilent 1260 Infinity high performance liquid chromatography (HPLC) system was used with a Quaternary pump, UV-VIS detector at different wavelengths (210, 230, 250, 264, 290, 316, and 360 nm). The volume of CF4 injected to 100 μL after filtration on 0.22 μm PTFE membranes (Millipore®) chromatographic to a column SB-C18, 4.6x250mm with 5 μm particle size A mobile phase of the HPLC consisted of acetonitrile and water: starting with a gradient of 60:40 v/v at 80:20 v/v for 2 minutes, followed by a 5:95 v/v system for 6 minutes in a flow of $2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Linearity, limit of quantification and limit of detection, precision and accuracy were evaluated for a quantification of the OAC. (4, 16, 32, 64, 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) diluted in acetonitrile. The pure compounds were dissolved in CDCl_3 or CD_3OD at 1,000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Mass spectra were obtained with an ESI-MS Quattro LCZ (Micromass, Manchester, UK). ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra were recorded in solution using a Bruker Avance III 400 MHz spectrometer.

Well-Diffusion Method

The agar diffusion test was performed with an inoculum of Xac 306 at a concentration of 10^8 CFU. mL^{-1} inoculated in petri dish with nutrient agar (AN) by pour-plate technique. Wells of 9 mm diameter was performed and filled with 150 μL of supernatant of *P. aeruginosa* cultures with different concentrations of $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ at 0, 4, 8 and 12 days of production. Sterile culture medium was used as a negative control. The Plates were incubated at 28 °C for 24 h. The reading was made by measuring the inhibition halos (mm) minus the well diameter (Balouiri et al., 2016; Valgas et al., 2007) .

Disco-Diffusion Method in Agar

To evaluate the antibiotic action of the pure substance against the strains studied, the disc-diffusion test was performed in agar, according to the methodology recommended by NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2012). The disks were prepared with a concentration of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{disk}^{-1}$ of OAC. The effect of the antibiotic compound under the different strains was evaluated placed the disk on Petri dish with 20 mL of Mueller-Hinton agar (MHA) inoculated with a cell suspensions of 10^8 CFU. mL^{-1} of different strain cultured. The negative control was only chloroform, the dilution solvent of the antibiotic compound. The plates were incubated at 37 °C for 24 h, and the size of the inhibition halo diameter in millimetres (mm) was measured. The experiment was performed with biological replicates and the antibiotic effect was determined by the mean of the size of the inhibition halos formed around the wells.

Minimum Inhibitory Concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth microdilution method according to the methodology recommended to CLSI

guidelines. All tests were done on cation-adjusted Mueller-Hinton broth (MHB+) and the cell concentration was adjusted to approximately 5×10^5 CFU.mL⁻¹. After 18 h of incubation at 37 °C, the MIC was defined as the lowest concentration of the antibiotic OAC without visible growth. Experiments were performed by triplicate with three replicates at different periods.

Minimum Bactericidal Concentration

An aliquot of cells the wells from the MIC microbroth plate that had been incubated was resuspended and plated in fresh MHA, and the colonies were counted after incubation for 24 hours at 37 °C. Minimum Bactericidal Concentration (MBC) is defined as the first dilution of drug which resulted in a decrease of 99.9% over the initial bacterial titer of the starting inoculum. The experiments were performed with duplicates with three replicates.

The Resistance Risk of Multiple Pathogens to OAC a New Antimicrobial Compounds

This protocol was based on a variation and a combination of the techniques of multi / single pass and the methodology of MPC (Mutant Prevention Concentration) described elsewhere (Firsov et al., 2015; Metzler et al., 2013; Nagai et al., 2000). Briefly, to select OAC-RMs, serial passages of strains were performed daily with MHB containing consecutively increasing concentrations of OAC. An initial inoculum of 10^6 CFU.mL⁻¹ was dispensed into 96-well plates with 100 μ L per well. OAC was added at concentrations of 0, 0.25x, 0.5x, 1x, 2x 4x, 8x and 16x MIC. After 24 hours incubation at 35 °C and aliquot of 1 μ L of the well from OAC highest concentrations with visible growth were used to inoculate the subsequent fresh micro-broth plate. After the time of the multiple passage (21 days), the microorganisms of the wells with growth in the highest concentration of the antibiotic was blanced in three plates with antibiotic free agar. As well, adjacent wells without visible growth was evaluated (MBC). One colony was used for serial passage for 10 days without OAC and another cells were used to inoculate 100 mL of broth before 18h incubation at 37 °C under continuous shaking. .An aliquot of 100 μ L of the bacterial suspension was spread on agar containing 0, 1x, 2x, 4x, 8x, 16x MIC of OAC. The plates were incubated at 35 °C for 48 h. The MPC and the selection frequency to the original strain, their OAC-RM clones and revert mutant were determined as described the authors above. The experiments were performed with biological replicates.

Electronic Microscopy

Bacterial suspensions (10^{10} CFU) of the N315 and Kpn19 strains were incubated with and without OAC were spotted onto polylysine-coated glass slides and stored at 28 °C for 1 hr for drying. The slides were then fixed into a solution containing 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7) for a period of 12 h. After fixation, the slides were washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7) and post-fixed in a solution of 1% OsO₄ for 2 h. The samples were dehydrated in ethanol at concentrations of 70, 80, 90 and 100%, and then dried by critical point in CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer). After drying the slides were coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and visualized on Scanning Electron Microscopy (SEM, FEI Quanta 200).

For the performance of the assay of Transmission Electronic Microscopy (TEM), microorganisms were incubated with and without OAC, and centrifuged at 4000 rpm for 5 min. The pellets were resuspended, washed with PBS, centrifuged and fixed as described above. After dehydration in a series of ethanol, the material was included in Araldite®. Ultra-thin cuts of 60-70 nm (Leica ULTRACUT UCT Leica UCT) were made in the block and contrasted with 2% uranyl acetate for 15 min and lead citrate for 20 min and observed using on TEM (FEI Tecnai12).

Cytotoxicity assay

The LLCMK2 cell line was cultured into 96 well culture plate at a density of 2.5×10^4 cells/well as described a and incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. At confluence, non-adherent cells were removed by washing with sterile PBS. The medium containing different concentrations of OAC (0 to 32 µg/mL) were added to each well containing the cells, and the plates were incubated for 72 h. Cells cultured in growth medium alone or in the presence of 3% DMSO were used as controls. Cell viability was determined by the MTT [dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (Sigma Chemical Co., USA)] method according to the manufacturer's recommendation. The concentration of the compounds needed to inhibit the viable cells up to 50% by regression analysis correspond the 50% cytotoxic concentration (CC50/72h) and the selectivity index (SI) were calculated using this equation: $SI = CC50/IC50$.

Statistical analyses.

Statistical analysis and graphics were performed by using R software (www.r-project.org). Statistically significant differences were calculated by Tukey statistical method. P values of ≤ 0.05 were considered significant.

Results

Well-diffusion Test

The supernatant of *P. aeruginosa* strain LV cultures in NB with different concentrations of CuCl₂.2H₂O was evaluated by well-diffusion test in agar to determine antibiotic activity against Xac306. The mean \pm standard deviation of the inhibition zone diameter to each treatment at 1, 4, 8 and 12 days of fermentation are shown in **Table 1** – Antibiotic supernatant activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain with different concentration of CuCl₂.2H₂O against Xcc306 by the well-diffusion method in agar. Inhibition zone diameter [mean \pm sd1(mm)] at different fermentation days

. Bacterial cultures with 10, 15, 25 and 50 mg.L⁻¹ of CuCl₂.2H₂O present a significant difference in the inhibition halo diameter of cultures with 100, 150 and 200 mg.L⁻¹ of CuCl₂.2H₂O at the 4, 8 and 12 days of fermentation with a confidence level of 95% ($\alpha = 0.05$). In addition, no antimicrobial activity was observed in the cultures in the absence of CuCl₂.2H₂O and on the first day of fermentation.

OAC Obtaining

The OAC was extracted from the supernatant of *P. aeruginosa* cultures by partitioning with dichloromethane (PD) and purified by chromatographic absorption techniques. The fourth fraction obtained for flash chromatography (CF4) was collected and analyzed for HPLC. Determining of the method linearity ($R^2 = 0.999$), detection limit (0.3 mg. L^{-1}) and the limit of quantification (1 mg. L^{-1}), was observed that about 80% of the fraction obtained in the flash chromatography corresponded to OAC (**Fig. S1**). The peak with retention time of 3.611 min was quantified and collected to thereby obtain OAC pure, which had a mass of 265.92 m/z (**Fig. S2**) in according with (De Oliveira et al., 2016).

Figure 1 shows OAC production for each culture medium at the four different sample collection times. OAC not detected on the first day production and medium without $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ copper chloride not produced OAC. No Significant differences between cultures with concentrations less than or equal to 50 mg.L^{-1} in the production of OAC. The highest productivity was in medium culture between 25 and 50 mg.L^{-1} $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and those are significantly different of medium with concentrations greater or equal to 100 mg.L^{-1} of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ on days 4, 8 and 12 of fermentation, with 95% confidence.

Bioactivity and Resistant Mutants to OAC

The results to obtain OAC resistant mutants in the presence sub-MIC level over a period of 21 days (OAC-RM21) are shown in the **Figure 2**. Serial passaging of *K. pneumoniae* (ATCC 10031 and CRE Kpn-19) cultures on OAC containing medium led to a moderate loss in susceptibility, the MIC of OAC increased gradually mainly to: 4-fold elevation and 8-fold after the 21st passage for ATCC 10031 and Kpn-19, respectively. However, the MIC decreases again when the mutants are serially pegged for 10 days in medium without the OAC (OAC-RM+10), suggesting a tendency to retreat to the original MIC (**Figure 3**). Serial passage of *S. aureus* and *E. faecium* in the presence different concentrations of OAC over a period of 21 days failed to produce resistant mutants.

The **Table 2** presents the OAC susceptibility tests disc diffusion on agar ($10 \mu\text{g.Disc}^{-1}$), MIC and MBC for every bacteria include OAC-RM21 and OAC-RM+10. The MPC was determined as the OAC concentration required to prevent the recovery of resistant mutants when $\sim 10^{10}$ CFU to each strain was applied on OAC-containing agar plates (**Figure 3**). After 48 h of incubation at 35°C , no resistant colonies were detected, all strains were unable to produce mutant resistant even when plating on media with a low dose ($4 \times \text{MIC}$) of OAC, giving the calculated frequency of resistance to OAC of $< 10^{-9}$. The frequencies of resistant clones in presence of $2 \times$ OAC were determined as well. The MPC and frequencies are presented in the **Table 2**.

Ultrastructural analysis

The ultrastructural details of fluopsin C-treated cells were further examined at 1 h post-treatment with Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM). SEM exhibits the antibiotic bioactivity of OAC. When clinical isolates of *K. pneumoniae* and MRSA were incubated with OAC for one hour, a reduction in the number of CFU and decrease in extracellular matrix formation was observed compared to the control in the absence of OAC (**Figure 4**). Treatment with

OAC caused pronounced morphological alterations in the planktonic cells (**Figure 4 B**). Deformed cells were observed treatment compared to untreated cells (**Figure 4 A**), presenting a disruption of the cell wall forming depressions in the configuration of the bacterial skeleton (**Figure 4 B**). Cytoplasmic alteration and vacuolization was apparent after treatment with OAC compared with control cells by TEM (**Figure 5**). The plasma membrane was intact but the cell exhibited low electron density possibility from failure of the ionic pumps in the plasma membrane.

Cytotoxicity assay

The LLC-MK2 Cell cultures were tested for sensitivity to OAC. The **Fig. S5** shows a percentage of viable cells treated with different concentrations of OAC after 72 h of incubation. Less concentrations to $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of OAC have a cell viability greater than 90%. The $\text{CC}_{50 / 72 \text{ h}}$ was near $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of the pure compound, according to the MTT assay.

Discussion

Current treatments of infections are often unsuccessful, due to continued selection of MDR against a large number of antibiotics that evidence the need for the discovery of novel drug candidates. Several studies have presented the antibiotic effect of the secondary metabolites of *Pseudomonas sp.* against clinical pathogenic resistance bacterial. The F3d fraction, produced by *P. aeruginosa* LV strain, showed activity against N315, BEC9393, ATCC 10031 and CRE-*Kpn 19* strains (Cardozo et al., 2013; Kerbaudy et al., 2016), being OAC the major component with antibiotic activity of these fractions (De Oliveira et al., 2016). OAC production was undetected in the absence of $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ during 12 days of the fermentation indicating that copper is essential part of the activity molecule. In this work, a culture medium with concentrations between 15 to $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ had a productivity up to $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in 8 days, increasing the OAC production by up to 15 fold in comparison with previously published methodologies (Cardozo et al., 2013; de Oliveira et al., 2016; Kerbaudy et al., 2016). Apart from the conditions of culture, the purification procedures are also different which facilitated the obtaining of the pure compound.

Substance OAC demonstrated a potential increase in 250-fold activity when compared with the F3d fraction, and it was required 50-fold less concentration for the formation of inhibition halos with equal or greater diameters when compared to the published data with the less purified fractions. In addition, OAC showed a decrease in MIC of 30 and 125-fold, when tested against *K. pneumoniae* and *S. aureus*, respectively (Cardozo et al., 2013; Kerbaudy et al., 2016).

OAC had a potent effect against Gram positive and Gram negative bacteria with MICs comparable to commercial antibiotics commonly used in clinical practice such as vancomycin and new antibiotics such as linezolid, teixobactin and daptomycin (Firsov et al., 2015; Ling et al., 2015). The electronic microscopy allows to observe the bactericidal activity of OAC in treated cultures compared to not treat. These SEM and TEM studies enabled us to demonstrate that OAC induced cell lysis and degrading the cellular matrix. Similar effects with F3d fraction has been reported elsewhere (Cardozo et al., 2013; Kerbaudy et al., 2016).

Previous studies using serial passages method selected RMs of *k. pneumoniae*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* to antibiotics such as Fluoroquinolones, Linezolid, Daptomycin, Vancomycin, increasing MIC 100 fold more than the original strain in a few days (Firsov et al., 2006, 2015; Ling et al., 2015; Nagai et al., 2000; Strukova et al., 2017). In the present study, OAC-RMs were no obtaining of Gram positive bacteria after 21st serial passages in presence of sub-inhibitory concentrations of OAC. ATCC 10031 produced OAC-RM21 increasing 4 x MIC but their stability has been affected when 10th transfers have been made on antibiotic-free media, resulting in the decrease from MIC, in some cases, return to the original MIC. These results suggest that OAC-tolerant clones of *K. pneumoniae* can be obtained with the multi-pass (21st days) technique in the presence of the antibiotic (**Table 2** and **Figure 2**). However, the MIC increase is lower when compared with another antibiotics of previous studies, mentioned above.

Otherwise, MDR isolated of *K. pneumoniae* show best resistance mechanism. CRE-Kpn19 produced OAC-RM21, which elevated 8x MIC (from 2 to 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$). However, the MPC just increment in 2 fold (from 8 to 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$), which suggests, a great difficulty of the bacteria to generate resistance to OAC in concentrations $>16 \mu\text{g ml}^{-1}$. In addition, the resistance frequencies to OAC were inferior of 10^{-9} demonstrating a low probability to produce spontaneous RM's. Likewise, it is possible that the increase of the MIC of CRE-Kpn19 was possibly by intrinsic resistance mechanisms such as efflux pumps, can is evading the action of OAC. Further molecular studies should be made to determine which defence mechanisms.

Research of the novel antibiotics without resistance has been published (Ling et al., 2015; Moreira et al., 2016). However, just were evaluated against few susceptible strains. The method in this work allowed and showed the importance to evaluate the resistance risk of new antibiotic against multipathogens and their RMs with little compound expense. Proposes of molecular techniques (Andersson, 2015; Martinez, 2011) and dynamic models of 'anti-mutant' ratios (Firsov et al., 2015; Strukova et al., 2017; Yu et al., 2017) also are important methods that can to improve the prediction mutational resistance of promisors antimicrobial substances before its clinical introduction.

Though the cytotoxicity in epithelial cell, OAC have a high potential for the development of a new antibiotic for clinical use after improve the selectivity and to achieve preclinical assays. Elementary analysis, mass spectrometry, chemical proprieties and biological activity indicate that OAC is identical to YC 73, a compound of the fluopsin/thioformin family (**fig. S2 - S4**) produced by *Pseudomonas* sp and described in earlier studies (Itoh; Inuzuka; Suzuki, 1970; Egawa; Umino; Yukio, 1971; Otsuka et al., 1972).

Conclusions

This work determined that the best concentration of $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in the culture medium for OAC was $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with a mean production of $8.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Two chromatographic methods of CLAF and HPLC were developed to obtain a high degree of purity of the compound. OAC showed a potent in vitro effect with MICs and CBMs $\leq 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for the parent strain and increase of up to 8x MIC to OAC-RM21. This is the first activity

and resistance risk study, evaluated by a renovate microdilution multi-pass technique, of OAC against MDR's and their OAC-RMs strain. The results obtained may lead to the revival of OAC (YC 73 or fluopson C) as a potent antibiotic with low frequency of inducing antibiotic-resistant mutants and can be a good treatment against biofilms that are main problems in health services and in the biotechnological industries for persister cells. However, further studies are needed to determine the *in vivo* efficacies and cytotoxic effects for their utility in clinical applications and therapeutic potential for the treatment of infections, especially those of difficult treatment caused by MDR.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to CNPq, CAPES for the financial support to this study. We would also like to thank Laboratory for Electron Microscopy and Microanalysis – LMEM UEL/FINEP for help with the electron microscopy experiments.

References

- Andersson, D. I. (2015). Improving predictions of the risk of resistance development against new and old antibiotics. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 894–898. doi:10.1016/j.cmi.2015.05.012.
- Arias, C. A., and Murray, B. E. (2012). The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 266–78. doi:10.1038/nrmicro2761.
- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibensouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- Beyond serial passages new methods for predicting the emergence resistance Martinez 2011.pdf.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., et al. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1–12. doi:10.1086/595011.
- Cardozo, V. F., Oliveira, A. G., Nishio, E. K., Perugini, M. R. E., Andrade, C. G. T. J., Silveira, W. D., et al. (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus (MRSA) strains. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 12, 12. doi:10.1186/1476-0711-12-12.
- de Oliveira, A. G., Murate, L. S., Spago, F. R., Lopes, L. de P., Beranger, J. P. de O., Martin, J. A. B. S., et al. (2011). Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biol. Control* 56, 125–131. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.10.008.
- de Oliveira, A. G., Spago, F. R., Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., Da Silva, C. S., Barazetti, A. R., et al. (2016). Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front. Microbiol.* 7, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2016.00113.
- Dong, Y., Zhao, X., Domagala, J., and Drlica, K. (1999). Effect of Fluoroquinolone Concentration on Selection of Resistant Mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus* Effect of Fluoroquinolone Concentration on Selection of Resistant Mutants of *Mycobacterium bovis* BCG and *Staphylococcus aureus* †. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 7–10.
- Egawa, Y., Umino, K., and Yukio, I. (1971). TIBIOTIC YC 73 OF PSEUDOMONAS ORIGIN. IP STRUCTURE AND SYNTHESIS OF THIOFORMIN AND ITS CUPRIC COMPLEX (YC 73). *J. Antibiot. (Tokyo).*, 225–226. Available at: https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/24/2/24_2_124/_pdf.
- Firsov, A. A., Golikova, M. V., Strukova, E. N., Portnoy, Y. A., Romanov, A. V., Edelstein, M. V., et al. (2015). In vitro resistance studies with bacteria that exhibit low mutation frequencies: Prediction of “antimutant” linezolid concentrations using a mixed inoculum containing both susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1014–1019. doi:10.1128/AAC.04214-14.
- Firsov, A. A., Smirnova, M. V., Lubenko, I. Y., Vostrov, S. N., Portnoy, Y. A., and Zinner, S. H. (2006). Testing the mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to daptomycin and vancomycin in an in vitro dynamic model. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 1185–1192. doi:10.1093/jac/dkl387.
- Itoh, S., Inuzuka, K., and Suzuki, T. (1970). New antibiotics produced by bacteria grown on n-paraffin (mixture of C12, C 13 and C14 fractions). *J. Antibiot.*

- (Tokyo). 23, 542–545. Available at: https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/23/11/23_11_542/_pdf.
- Kerbaay, G., Vivan, A. C. P., Simões, G. C., Simionato, A. S., Pelisson, M., Vespero, E. C., et al. (2016). Effect of a Metalloantibiotic Produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 17, 0–0. doi:10.2174/138920101704160215171649.
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., et al. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 517, 455–459. doi:10.1038/nature14098.
- Martínez, J. L., Baquero, F., and Andersson, D. I. (2011). Beyond serial passages: New methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11, 439–445. doi:10.1016/j.coph.2011.07.005.
- Metzler, K., Drlica, K., and Blondeau, J. M. (2013). Minimal inhibitory and mutant prevention concentrations of azithromycin, clarithromycin and erythromycin for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 631–635. doi:10.1093/jac/dks461.
- Moreira, W., Aziz, D. B., and Dick, T. (2016). Boromycin kills mycobacterial persisters without detectable resistance. *Front. Microbiol.* 7, 1–7. doi:10.3389/fmicb.2016.00199.
- Munhoz, L. D., Fontequ, J. P., Santos, I. M. O., Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., Goya, E. T., et al. (2017). Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Cogent Food Agric.* 3, 1–16. doi:10.1080/23311932.2017.1282592.
- Murate, L. S., Oliveira, A. G. De, Higashi, A. Y., Barazetti, A. R., Simionato, A. S., Santos, C., et al. (2015). Activity of Secondary Bacterial Metabolites in the Control of Citrus Canker. 295–303.
- Nagai, K., Davies, T. A., Pankuch, G. A., Dewasse, B. E., Jacobs, M. R., and Appelbaum, P. C. (2000). In vitro selection of resistance to clinafloxacin, ciprofloxacin, and trovafloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2740–2746. doi:10.1128/AAC.44.10.2740-2746.2000.
- Otsuka, H., Niwayama, S., Tanaka, H., Take, T., and Uchiyama, T. (1972). An antitumor antibiotic, no. 4601 from *Streptomyces*, identical with YC 73 of

- Pseudomonas* origin. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 25, 369–370.
- Strukova, E. N., Portnoy, Y. A., Zinner, S. H., and Firsov, A. A. (2017). Species differences in ciprofloxacin resistance among Gram-negative bacteria: can ?anti-mutant? ratios of the area under the concentration?time curve to the MIC be achieved clinically? *J. Chemother.* 9478, 1–7. doi:10.1080/1120009X.2017.1335980.
- Valgas, C., Machado de Souza, S., A Smânia, E. F., and Smânia Jr, A. (2007). Screening Methods To Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian J. Microbiol.* 38, 369–380. doi:10.1590/S1517-83822007000200034.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T A peer-reviewed J. Formul. Manag.* 40, 277–83. doi:Article.
- Yu, G., Baeder, D., Regoes, R., and Rolff, J. (2017). Predicting Drug Resistance Evolution: Antimicrobial Peptides Vs. Antibiotics. *bioRxiv*, 1–24. Available at: <http://biorxiv.org/content/early/2017/05/23/138107>.

Table 1 – Antibiotic supernatant activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain with different concentration of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ against Xcc306 by the well-diffusion method in agar. Inhibition zone diameter [mean \pm sd¹(mm)] at different fermentation days

CuCl ₂ ·2H ₂ O (mg.L ⁻¹)	Fermentation Day			
	1	4	8	12
0	NA*	NA	NA	NA
5	NA	3,50 \pm 1,51 ^{bc}	11,16 \pm 1,16 ^{bc}	11,83 \pm 1,47 ^{bc}
10	NA	11,50 \pm 1,22 ^{ab}	13,83 \pm 1,32 ^{ab}	13,66 \pm 1,36 ^{ab}
15	NA	12,83 \pm 1,16 ^{ab}	13,83 \pm 1,47 ^{ab}	14,33 \pm 1,21 ^{ab}
25	NA	14,50 \pm 3,61 ^a	16,50 \pm 1,40 ^a	16,66 \pm 0,81 ^a
50	NA	14,66 \pm 1,86 ^a	14,83 \pm 1,60 ^{ab}	15,00 \pm 1,67 ^{ab}
100	NA	0,66 \pm 0,51 ^c	7,66 \pm 1,50 ^{cd}	7,83 \pm 1,33 ^{cd}
150	NA	0,33 \pm 0,51 ^c	6,50 \pm 1,05 ^{de}	6,33 \pm 2,73 ^d
200	NA	0,33 \pm 0,51 ^c	2,50 \pm 1,38 ^e	3,50 \pm 2,58 ^d

¹ Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) in the column by Tukey's test.

* NA: No Activity.

Table 2 – The OAC susceptibility tests disc diffusion on agar (10 $\mu\text{g} \cdot \text{Disc}^{-1}$), MIC, MBC, MPC and mutant frequencies for parent strain and RMs.

Strain	OAC [†]	Halo (mm)	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MPC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mutant Frequency	
						2xMIC	4xMIC
MRSA N315	PS	40	0,5	1,0	4,0	$\sim 4,2 * 10^{-6}$	$\sim 9,2 * 10^{-9}$
	RM21	32	1,0	1,0	4,0	$\sim 2,6 * 10^{-8}$	$< 1,8 * 10^{-10}$
	RM+10	39	0,5	1,0	4,0	$\sim 5,0 * 10^{-7}$	$< 1 * 10^{-10}$
MRSA BEC9393	PS	40	1,0	1,0	4,0	$\sim 6,3 * 10^{-8}$	$< 1,5 * 10^{-10}$
	RM21	38	1,0	1,0	4,0	$\sim 6,5 * 10^{-7}$	$< 2,5 * 10^{-10}$
	RM+10	40	1,0	1,0	4,0	$\sim 8,8 * 10^{-7}$	$< 4,4 * 10^{-10}$
ATCC 6569	PS	36	1,0	1,0	4,0	$\sim 4,4 * 10^{-8}$	$< 6,0 * 10^{-9}$
	RM21	35	1,0	1,0	4,0	$\sim 6,0 * 10^{-7}$	$< 1,3 * 10^{-10}$
	RM+10	33	1,0	1,0	4,0	$\sim 9,8 * 10^{-7}$	$< 2,4 * 10^{-10}$
VRE-170	PS	39	1,0	1,0	4,0	$\sim 8,0 * 10^{-8}$	$< 8,8 * 10^{-9}$
	RM21	28	2,0	2,0	8,0	$\sim 4,3 * 10^{-6}$	$< 2,5 * 10^{-10}$
	RM+10	32	1,0	1,0	4,0	$\sim 8,4 * 10^{-7}$	$< 5,7 * 10^{-10}$
ATCC 10031	PS	30	1,0	1,0	4,0	$\sim 3,3 * 10^{-8}$	$< 1,6 * 10^{-10}$
	RM21	21	4,0	4,0	8,0	$\sim 3,8 * 10^{-7}$	$< 1,9 * 10^{-10}$
	RM+10	28	2,0	2,0	4,0	$\sim 6,6 * 10^{-7}$	$< 3,2 * 10^{-10}$
CRE <i>kpn19</i>	PS	22	2,0	2,0	8,0	$\sim 4,0 * 10^{-8}$	$< 3,5 * 10^{-10}$
	RM21	9	16,0	16,0	16,0	$< 3,5 * 10^{-10}$	$< 3,5 * 10^{-10}$
	RM+10	12	4,0	4,0	8,0	$\sim 4,8 * 10^{-7}$	$< 2,4 * 10^{-10}$

[†] PS: parent strain; RM21: OAC-RM strain after 21st passages of the parent strain on antibiotic-containing media; RM+10: strain after 21st passages of the parent strain on antibiotic-containing media plus 10th passages on OAC-free media.

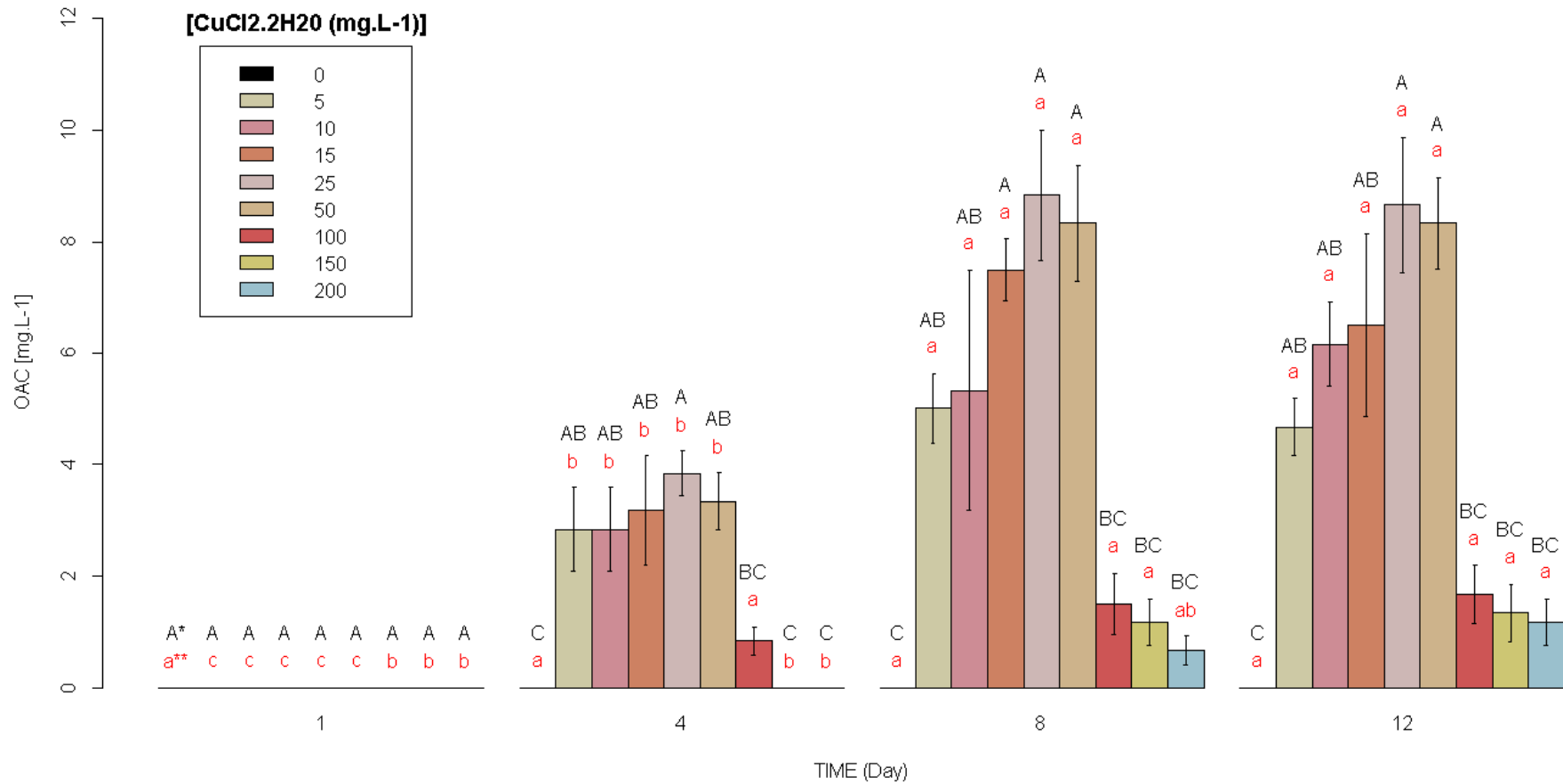


Figure 1 – Production of OAC in NB with different concentrations of copper chloride dehydrate at various fermentation times. (*) Capital letters different have significant differences between treatments on the same day and (**) Lowercase letters different present significant differences on the days of fermentation for the same treatment

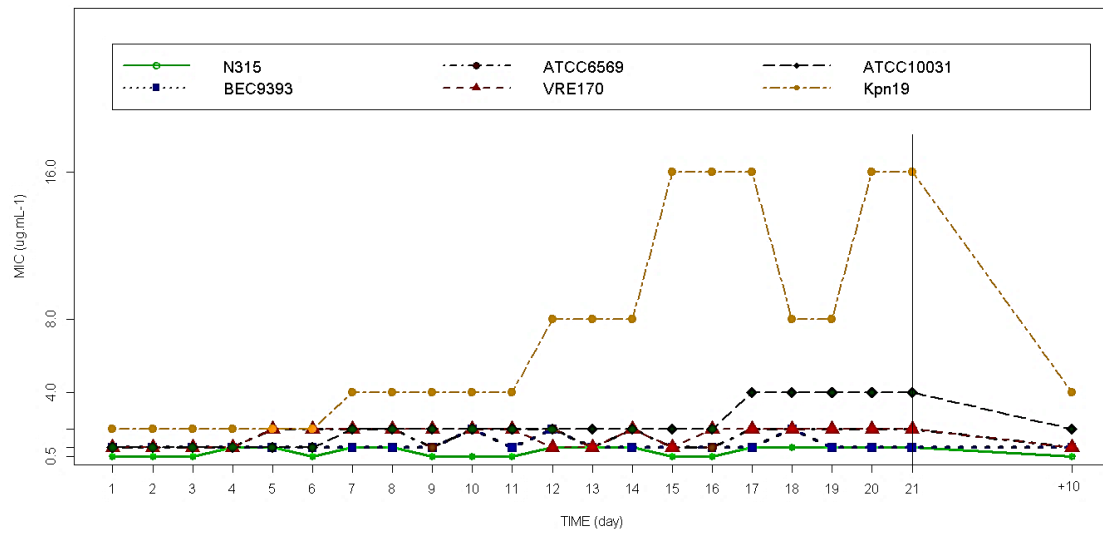


Figure 2 – Loss in susceptibility of *S. aureus*, *E. faecium* and *K. pneumoniae* 21 serial passage on OAC-containing MHB (OAC-RM21) and the final MIC when the mutants are serially pegged for 10 days in OAC free medium (OAC-RM+10)

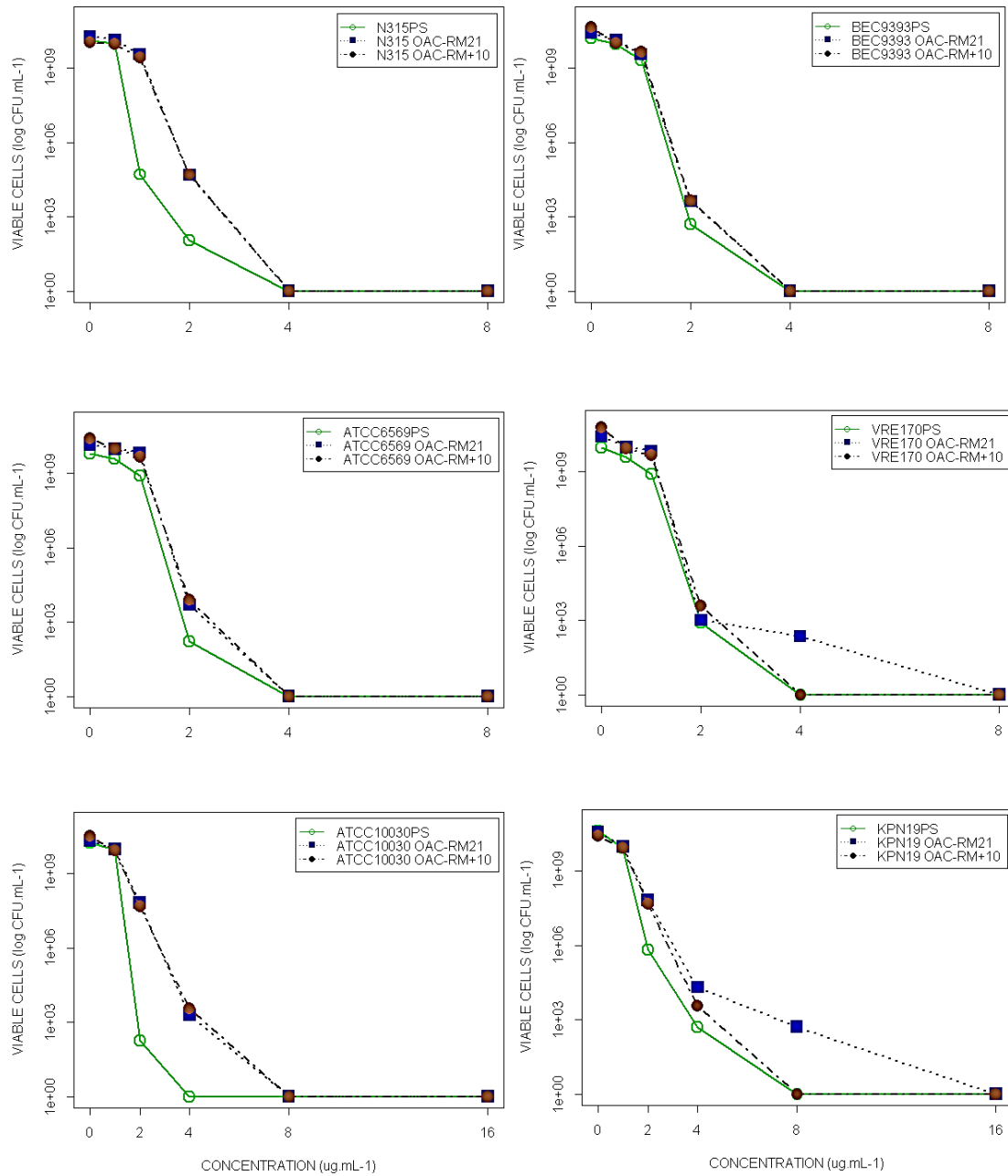
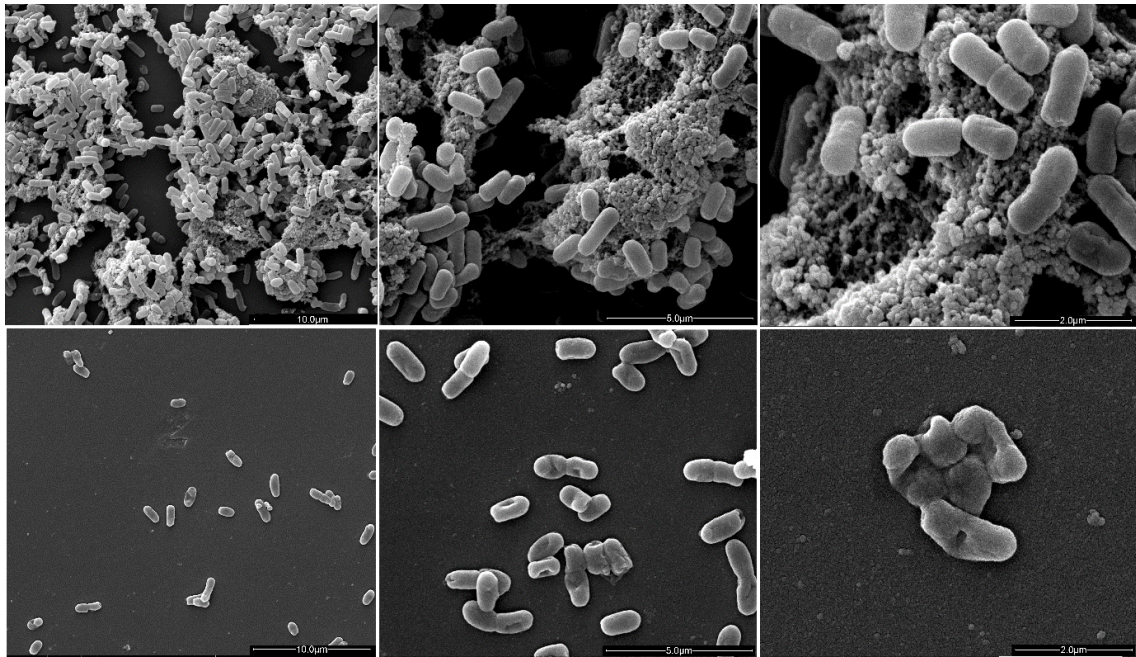


Figure 3 – OAC-MPC determination with *S. aureus* (MRSA N315 and MRSA BEC9393), *E. faecium* (ATCC6569 and VRE 170) and *K. pneumoniae* (ATCC 10031 and CRE-Kpn19) parent and OAC-RMs strains.

A



B

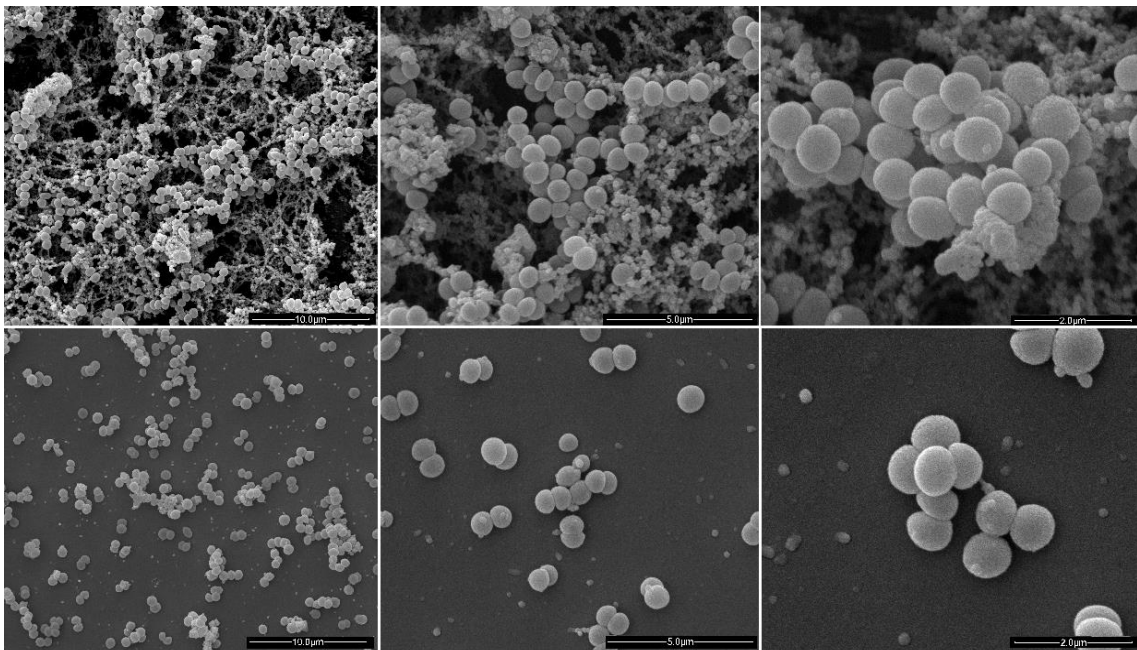
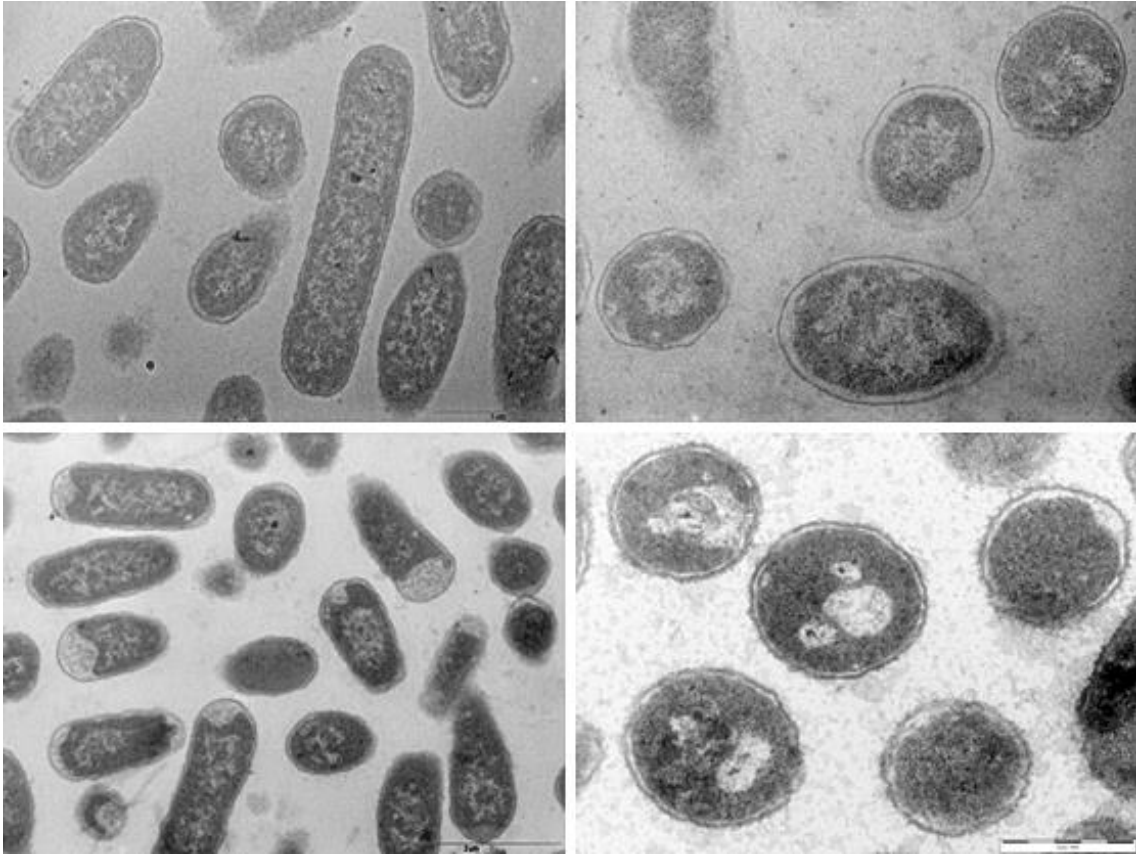


Figure 4 – Scanning electron micrographs (SEM). (A) Above, control (not treated), large number of *Klebsiella pneumoniae* present with intact appearance and high extracellular polysaccharides production. Down, *K. pneumoniae* treated with fluopycin C (1h), showing decreased number of bacteria presenting a disruption of the cell wall forming depressions in the configuration of the bacterial skeleton and lessened of extracellular matrix. (B) Above, MRSA-N315 control, great number of bacteria with intact appearance and high extracellular polysaccharides production. Down, MRSA-

N315 strain treated with fluopsin C (1h), showing decreased number of bacteria and extracellular matrix.

A



B

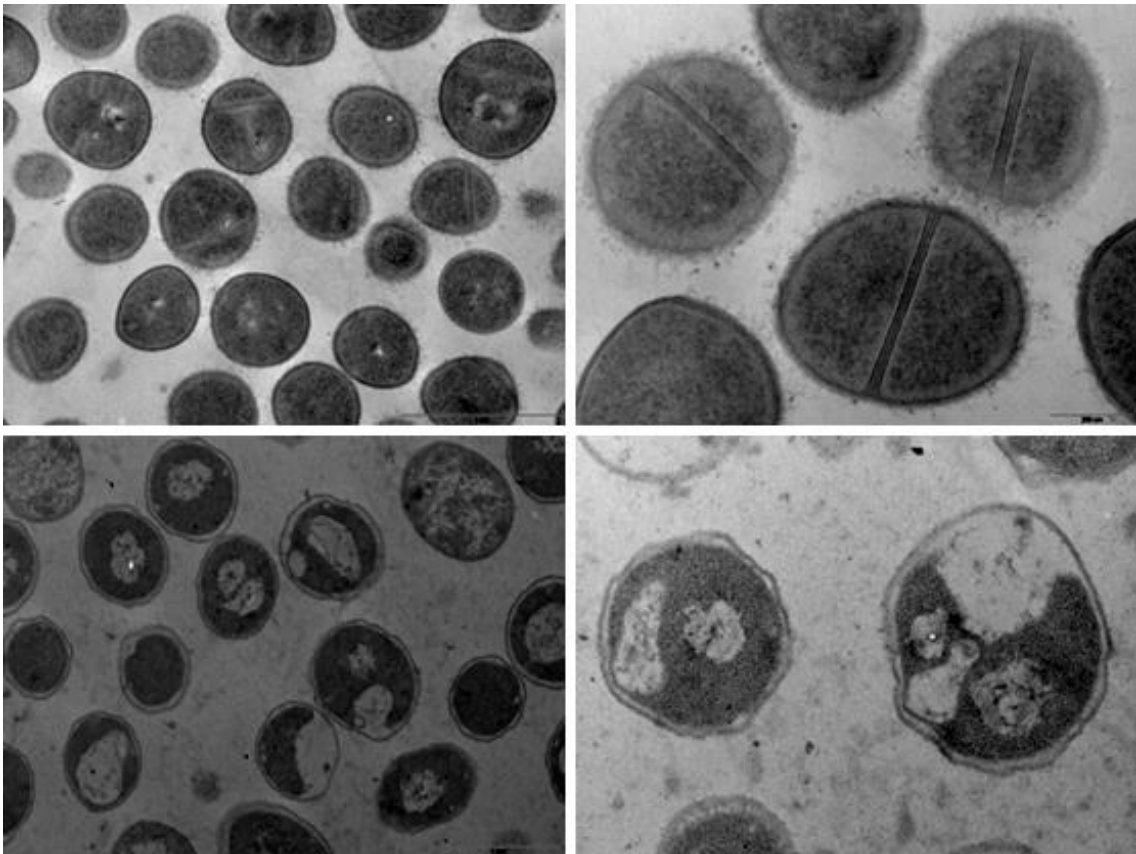


Figure 5 – Transmission electron micrographs. **A)** Control (above) and fluopsin C-treated cells (down) of *K. pneumoniae*. **B)** Control (above) and OAC-treated cells (down) of MRSA. TEM studies enabled us to demonstrate that OAC-induced internal cell damage

Supplementary Material

ACTIVITY AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT CLINICAL STRAINS AND PREDICTIONS OF THE RISK OF RESISTANCE DEVELOPMENT TO ORGANOCOPPER ANTIMICROBIAL COMPOUND

Miguel Octavio Pérez Navarro¹, Galdino Andrade^{1*}

¹Laboratório de Ecologia Microbiana, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

*Corresponding author: Galdino Andrade, Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia. CEP 86051-990, Londrina, Brazil. gal.andrade7@gmail.com

Supplementary Figures

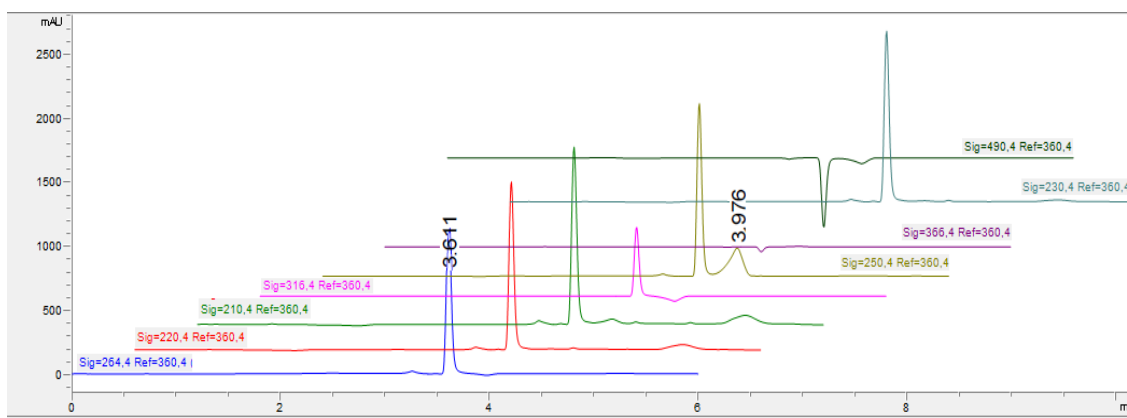


Fig. S1 – HPLC chromatogram of CF4 fraction in different wavelengths (264, 220, 210, 316, 250, 366, 230, 290 nm, respectively). The peak with retention time of 3.611 min was quantified ($R^2 = 0.999$) and collected

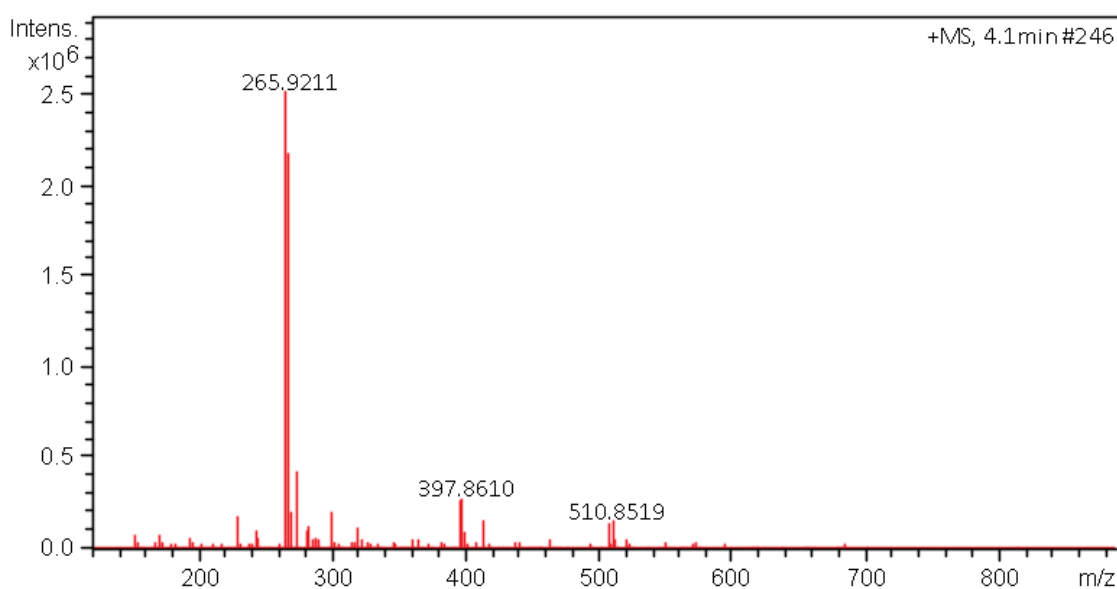


Fig. S2 – ESI-MS (positive mode) of the natural organocopper antibiotic compound (OAC) produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. Mass = 265.92 m/z

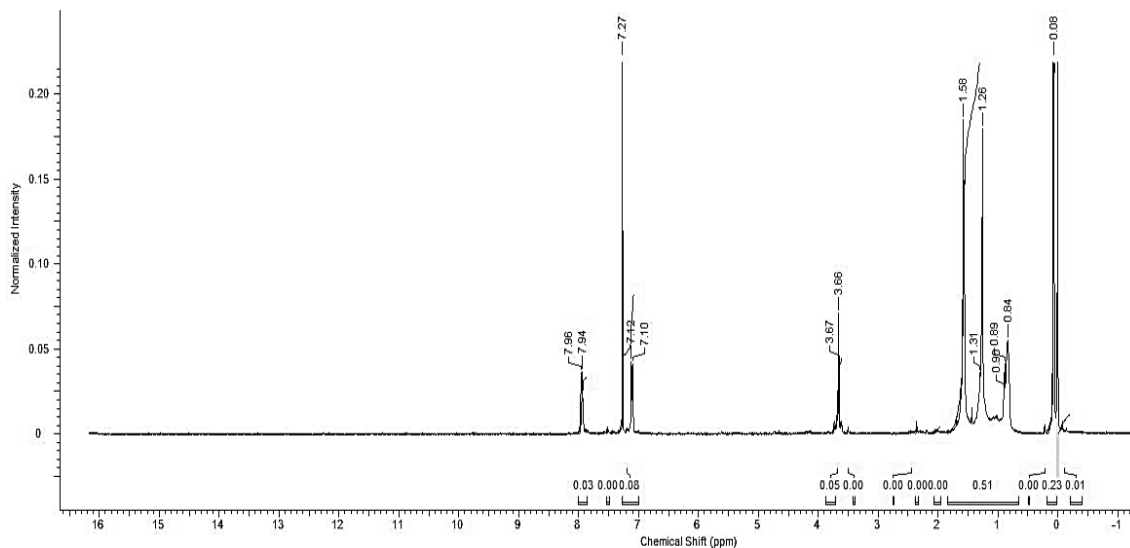


Fig. S3 – ^1H NMR of the organocopper antibiotic compound (OAC) produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain (300 MHz; CDCl_3)

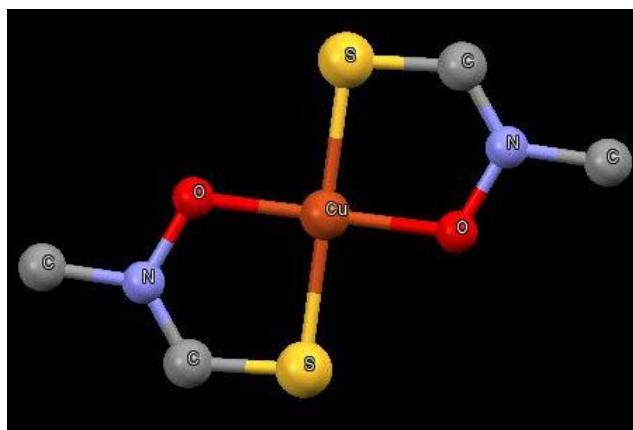


Fig. S4 – Chemical structure of organocopper antibiotic compound (OAC) identical to fluopsin C

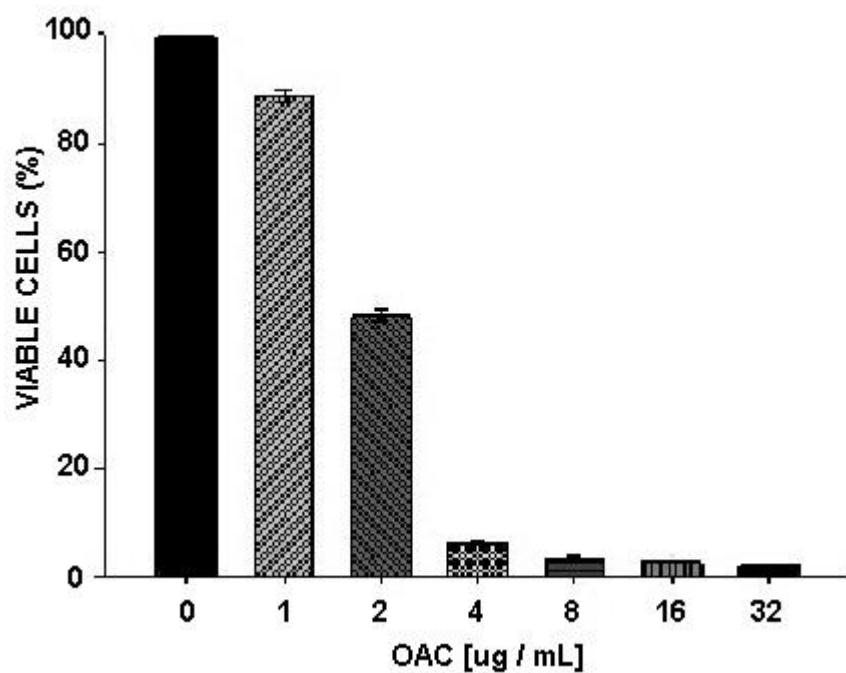


Fig. S5 – Cytotoxicity analysis with MTT assay in LLCMK2 cells after 72h of treatment. OAC was added in different concentration of 0 - 32 ug.mL⁻¹.

ARTIGO II

Journal: Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Instructions to authors: <http://aac.asm.org/site/misc/ifora.xhtml>

**Efficacy of fluopsin C in preclinical models of *Klebsiella pneumoniae*:
Cytotoxicity, sepsis model and histopathology studies.**

Miguel Octavio Pérez Navarro, Galdino Andrade,^{1*}

¹Laboratório de Ecologia Microbiana, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR 86057-970, Brazil

***Address correspondence to:** Galdino Andrade, gal.andrade7@gmail.com,

Department of Microbiology, Londrina State University, CEP: 86051-990, Londrina, Brazil; Tel/Fax: +554333714791; E-mail: andradeg@uel.br

Running head: Efficacy of fluopsin C in preclinical models

ABSTRACT

The clinical development of antibiotics with action against untreatable *Klebsiella pneumoniae* is a priority. Fluopsin C is an antibiotic with high activity against multidrug-resistant (MDR). We investigated the clinical potential of fluopsin C to treat by MDR infections. The therapeutic efficacy of fluopsin C given by intravenous administration was evaluated in alternative and murine models of *K. pneumoniae* acute sepsis. Fluopsin C showed *in vitro* toxicity and the lethal dose was determinate in *Tenebrio molitor* larvae. The efficacy of fluopsin C was also demonstrated in mice. In addition, acute and chronic histopathology studies showed no toxicity in kidney and moderate toxicity in liver. These results support the further evaluation of fluopsin C as a novel therapeutic agent for the treatment of MDR sepsis infections.

INTRODUCTION

Klebsiella pneumoniae is a gram-negative, facultative anaerobic, primarily opportunistic bacterium that can be nosocomial or community acquired, is a difficult-to-treat human pathogen causing a wide range of infections, especially in the respiratory tract. These infections, such as pneumonia, cystic fibrosis and sepsis are disease where *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae infections are associated with therapeutic failure and increased mortality (1, 2). The challenge is discovery and development a novel antibiotics with high activity against multidrug-resistant (MDR) mainly untreatable Gram negative bacteria (3). Currently, few antibiotic compounds are in late stage of pre-clinical or clinical development.

The development of molecules complexes with metals as potential medicinal agents has been on the rise of the last decade (4). Fluopsin C is an organocopper antibiotic compound that has been purified and isolated from, *Pseudomonas sp* and *Streptomyces*. Previous studies demonstrated that fluopsin C exhibited strong antimicrobial properties (5–7). In fact, our research group has demonstrated the high antibiotic activity associated with the bactericidal effects against planktonic cells and biofilm of KPC-producing *K pneumoniae* isolates, making this substance a great candidate to develop new antibiotics to use in the control of infections caused by KPC-producing strains and other MDR (8, 9).

Consequently, fluopsin C should be evaluated to confirm the possibility to use this antibiotic substance as an alternative to treat human infections. Thereby, new assays to evaluate the toxicity, pharmacokinetic and efficacy of fluopsin C as well as histology and pathology studies in organs are required to determine the potential therapeutic of this old antibiotic compound. In this study, to evaluate the hemolytic and cytotoxic of the

fluopsin C, we used blood and mammalian cells culture. Invertebrate models with larvae of *T. molitor* were used to evaluate the lethal concentration before to determine the efficacy against *k. pneumonia* KPC-isolated by intravascular administration of fluopsin C in experimental murine pilot model. As well, the profile and histopathology in liver and kidney were studied.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain. KPC-producing *K. pneumonia* (CRE-Kpn 19) is a hospital-acquired clinical isolate from a patient with bacteremia in University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. It is resistant to commercial antibiotics but was sensible *in vitro* to fluopsin C (8).

Antibiotics. Fluopsin C was produced by *P. aeruginosa* LV strain in nutrient broth supplied with 25 mg/L of cooper. After 10 days the bacterial culture was stopped and centrifuged for 20 min at 9000 rpm and 4 ° C, followed by the extraction of the supernatant with dichloromethane. The extract was purified by flash chromatography with silica gel 60 (0.04-0.062 mm, Macherey-Nagel) coupled to a low-pressure pump and washed using mobile phase with petroleum ether: dichloromethane: Ethyl Ether (65:25:10). A semi-preparative Agilent 1260 Infinity high performance liquid chromatography (HPLC) system was used to purify the antibiotic compound. The mobile phases used were acetonitrile and water with flow of 2mL.min⁻¹ and injection volume was 100 µL at column SB-C18, 4.6x250mm with 5 µm particle size monitored at 264 nm (UV –VIS). Fluopsin C was collected, dried and reconstituted in RPMI medium and DMSO 3%.

Hemolytic assay. Hemolytic activity was determined as described previously (10). By incubating suspensions of human red blood cells ten-fold serial dilutions of fluopsin C. Red blood cells were rinsed three times in PBS by centrifugation for 3 min at 3000 rpm at 25 °C. The red blood cells plus Triton X-100 (10%) were incubated at room temperature for 1 h (positive control), in RPMI (blank), or fluopsin C at concentrations of

0.2, 2.0, 20 and 200 ppm. The samples were centrifuged at 5000 rpm for 5 min at 25 °C, and the supernatant was separated from the pellet, and its absorbance measured at 540 nm. The relative optical density compared to that of the suspension treated with 10% Triton X-100 was defined as the percentage of hemolysis.

Cytotoxicity assay. The LLCMK2 cell was cultured into 96 well culture plate (2.5×10^4 cells/well) and incubated for 24 h at 37 °C with 5% CO₂ atmosphere. At confluence, non-adherent cells were removed by washing with sterile PBS. The medium containing different concentrations of fluopsin C (0, 0.2, 2, 20 and 200 ppm) were added in the respective concentrations and replicate and incubated for 24 h at 37 °C. Non-treat cells or cultured in the presence of DMSO 3% as considered as control. Cell viability was determined by the MTT [dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (Sigma Chemical Co., USA)] method according to the manufacturer's recommendation. The concentration of the antibiotic needed to inhibit the viable cells up to 50% by regression analysis correspond the 50% cytotoxic concentration ($CC_{50/24h}$).

Animals Experiments. The toxicity studies with *T. molitor* (Coleoptera) larvae was carried using larvae with 150 ± 20 mg, clear and uniform color, *T. molitor* was cultivated in our lab as described previously (11). All growth stages are kept together in single plastic containers with a rearing medium consisting of white flour and wheat bran to which bread and vegetables are added periodically. The surface of the culture was covered with filter that is sprayed with water to provide moisture on a daily basis. The containers are stored in dark places, at ambient humidity and under temperature-controlled conditions (28°C).

The mice used was immunocompetent female Swiss albino (7 ± 1 week old and 32 ± 3 g) maintained in polypropylene boxes with wood shaving bedding and provided with sterilized water and commercial feed (Nutival®) throughout the experiment. The mice were kept in ventilated shelving with temperature ($24\text{ }^{\circ}\text{C}$), humidity of (55%) and photoperiod of 12/12 hour controlled. The mammalian studies were previously submitted and approved by the Committee of Ethics in the Use of animals of the State University of Londrina (protocol n°6886.2015.28).

Lethal concentration in invertebrate model. To evaluate the cytotoxic effect of the fluopsin C, The invertebrate inoculation model used in larvae of *T. molitor* as described previously (11) with minor modifications. The infection was achieved by injecting the fluopsin C into the hemocoel using a Hamilton syringe, at the second or third visible sternite above the legs, in the ventral portion. Each larva in each group of 10 animals received 5 μL of the fluopsin C of two-fold dilution (2 - 64 μg per larva). S considered as a control group larvae injected with sterile diluent (placebo, RPMI with DMSO 3%). After infection all larvae were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Petri dishes containing rearing diet. The results were shown by the number survival, and melanization and response to physical stimulus by gently touching the larvae, were observing for eight days. All treatments was in triplicates.

Pharmacokinetic Studies. Serum antimicrobial concentrations were determined for seven groups of three healthy Swiss mice used for each collection time. Single dose i.v. administration of fluopsin C (2 mg/Kg of body weight). For sets of three animals 0, 15, 30, 60, 120, 240, 480 min after drug administration, blood samples were obtained

from mice via cardiac puncture concentrations of fluopsin C. The blood collected in microtubes was centrifuged immediately after collection at 3,000 rpm for 5 minutes at room temperature, and the serum was separated and stored in a freezer at -20 ° C until analysis.

Extraction of fluopsin C from serum was performed using acetonitrile at low temperature (~ 4 ° C), 500 µL of the solution containing the internal standard (Phenazine carboxamide-PCN) in acetonitrile was added to 100 µL of the serum collected at each time. The sample was vortexed and centrifuged at 4°C for 5 minutes at 3,000 rpm. The ACN: H₂O phase was filtered using 13 mm PTFE-pore filters of 0.22 µm - and the analysis was continued for fluopsin C quantification using ultra-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

Experimental murine model. Groups of 6 mice were inoculated intravenously (i.v.) with 0.1 mL different doses (0.5 – 16 mg/Kg) of fluopsin C or infected intraperitoneally (i.p.) with 0.5 mL different concentrations (10^5 to 10^9 UFC/ mL) of CRE-Kpn19 strain to determine of Lethal Doses (LD) or Lethal Inoculum (LI), respectively. Control group were injected with placebo. Mice were maintained under the same conditions as above and survival was observed for 48 h. The protective dose (PD) of fluopsin C was determined, antimicrobial therapy was initiated 4 h after of i.p. infection with a LI (4.1×10^7 UFC/ mL) of CRE-Kpn19. Groups of 12 mice were randomly ascribed to the following groups: (i) control 1 (infection with treatment placebo), (ii) fluopsin C administered once i.v. at 1 mg/Kg, (iii) fluopsin C once administered i.v. at 2 mg/Kg, (iv) fluopsin C administered i.v. at 3 mg/Kg, (v) fluopsin C twice administered i.v. at 1

mg/Kg/8h, (vi) fluopsin C twice administered i.v. at 2 mg/Kg/8h. Mortality was recorded over 96 h.

Histological Study. The histopathological analysis, cohorts of 2 mice were euthanized at 1, 10, 20, 40 days after treatment with 2 mg/Kg of fluopsin C or placebo, one i.v. dosing. Kidney and liver were excised and fixed in 10% neutral buffered formaldehyde. Paraffin-embedded tissues were dehydrated in ascending series of ethyl alcohol, diaphanized in xylol and included in paraffin. 5 μ m sections were stained with hematoxylin and eosin (H.E.). These sections were analyzed qualitatively and quantitatively.

The qualitative analysis was performed by sampling using ten magnified 400x images of the liver and five images enlarged 100x of the kidney of each animal. In the liver, the presence of congestion of veins and sinusoids, vacuolization of the hepatocyte cytoplasm, inflammatory infiltrate, necrosis and hemorrhage were evaluated. In the kidney, the presence of capillary congestion, edema, necrosis, inflammatory infiltrate and hemorrhage in the glomerular corpuscles were evaluated; In addition, the presence of cytoplasmic vacuolization, scaling and position of the nucleus in the cells lining the tubules present in the cortex were observed. These analyzes were based on scores: 0 - absent, 1 - discrete, 2 - moderate and 3 - accentuated.

For quantitative analysis, specific portions of organs are collected and compared using ImageProPlus software version 2.5.3. In the liver, we counted the number of hepatocytes with one or two nucleus, hepatocytes with condemned chromatin, and hepatocytes with vacuolization in the cytoplasm. In addition, the area of 100 nucleus of hepatocytes per animal was measured. In the kidney, the Bowmann area of ten

glomerular corpuscles of each animal was measured. In addition, the diameter of 50 proximal tubules and 50 distal tubules of each organ.

RESULTS

Cytotoxic and Hemolytic effect of fluopsin C *in vitro*. The cytotoxicity and hemolytic assays of fluopsin C on LLC-MK2 and human erythrocytes, respectively. fluopsin C at $\geq 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ showed highest toxic activities ($>90\%$) and the $\text{CC}_{50/24\text{h}}$ of both LLC-MK2 and red blood cells was near $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. When fluopsin C was lower than $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and no cytotoxicity or hemolytic effect was observed (Figure 1).

Toxicity of fluopsin C *in vivo*. Larvae of *T. molitor* treated with 2 and 4 μg of fluopsin C did not show toxicity effect, whereas those treated with 8 and 16 μg showed toxicity of 80% and 58%, respectively. In the concentrations of 32 and 64 μg per larva was observed high toxicity producing death of all larvae in 96 h (Figure 2 A).

After observed the high antibiotic activity of fluopsin C against *in vitro* on *K. pneumonia* (MIC = $2 \mu\text{g}/\text{mL}$), the therapeutic potential was evaluated in bacterial infection *in vivo*. Previously, the DL of fluopsin C was determinate, and doses less than 4 mg/Kg (LD_{50}) was not toxicity for mice at 96h while the doses increased the lethality was observed after 48h (Figure 2 B). Serum fluopsin C levels were no detected in any moment by HPLC-MS/MS methods.

Efficacy of Fluopsin C. The evaluation of the *in vivo* activity of fluopsin C was performed in a model of sepsis in animals, Swiss mice were i.p. infected with a LI_{90} of CRE-Kpn19 and later therapy with fluopsin C or placebo were carried. Mice treated with

a single dose of 2 mg/Kg and two doses of 1 mg/Kg/8h (treatments iii and v, respectively) showed a survival of 50% and 42% in 72h, respectively. Mice inoculated with only one dose of 1 mg/Kg (Treatment ii) showed a survival of 25% in 48h and 17% in 96h. Mice treated with 3 mg/Kg and two doses of 2 mg/kg/8h showed a death of all animals even faster than infected and non-treated (Figure 3).

Histopathological examination. Liver and kidney of mice were collected at 1, 10, 20, 40 days after treated with fluopsin C or placebo. In the control group no changes on the liver morphology was observed. All mice treated with placebo presented areas with discrete vacuolization of the hepatocyte cytoplasm and discrete inflammatory infiltrate. Mice treated with 2 mg/Kg of fluopsin C presented moderate vessel congestion, inflammatory infiltrate and hemorrhage and marked cytoplasmic vacuolization in all times (Table 1) and no necrotic area was observed during any time (Figure 4). Fluopsin C did not cause a significant change in the number of hepatocytes with one or two nucleus and condensed chromatin. Also differences among median of nuclear area of hepatocytes in each group to all time was observed (Figure 5A). The number of hepatocytes with vacuolated cytoplasm and displaced nucleus was also observed (Table 2).

The qualitative results of the kidneys were not observed capillaries congestion, edema and necrosis in glomerular corpuscles. A discreet inflammatory infiltrate and mild bleeding were observed. In the tubules, a slight vacuolization of the cytoplasm, scaling and nuclei positioned at the center of the cell. Differences among the sums of the glomerular corpuscles, changes in the Bowman's space and tubule diameters of the

kidney in each group were observed (Figures 5 B, C and D). The renal cortex showed no significant difference between mice treated with fluopsin C and placebo (Figure 6).

DISCUSSION

Current antibiotic treatments of *K. pneumoniae* infections are often unsuccessful, due to increasing rates of the presence of antibiotic resistance genes, MDR strains, and the number of drug candidates in clinical development is low. Secondary metabolites of *P. aeruginosa* in medium with copper were used to identify a class of metal complexes with biological molecules showing antibacterial activity. fluopsin C has potent in vitro activity against *K. pneumoniae*, including resistant strains or no susceptible to carbapenemem and is also active against other Gram-positive pathogens, including clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* (8, 9).

In previous studies, fluopsin C was associate with chemotherapeutic potential, but the high acute toxicity in animal showed unfeasible to use fluopsin C to treat MDR infection in humans (5, 12). Recent studies provide new data that support the development of fluopsin C as an alternative to treat infection (13, 14), indicating that fluopsin C showed similarity effect in LLCMK2 cell line and red blood cell after 24h of treated as observed in others studies (5, 6). In the other hand, fluopsin C increased $CC_{50/24h}$ when compared with previous studies with raw extract, where the cytotoxicity was not detected in F3 and F3d fractions (8, 15). However, in this fractions the activity is also less, possibility for the low fluopsin C concentration in the fraction due to the concentration of copper in the medium of culture.

The use of alternative methods with *T. molitor* can refine the number of mammalian animals in the *in vivo* experiments (11). Fluopsin C showed a LD_{50} of 4

mg/Kg for the Swiss mice and approximately 20 µg per larva (~3 mg/Kg) of *T. molitor*, indicating, that the results obtained provide information which be helpful before proceeding mammalian studies, reducing the number of animal in the experiment and is cheap. In this way, studies to measure bioactivity using larvae increasing each year (11, 16, 17).

The major problem of the most natural products is the low pharmacokinetic properties (18), despite the fluopsin C showed negligible bioavailability, increasing up to 40% after 72 h the rate and average life of Swiss mice infected with the clinical isolate *ERC-Kpn 19* protecting against sepsis when compared to untreated and infected mice. Dose of 2 mg/kg and two doses of 1 mg/kg/8h preserve around 30% of infected mice with *ERC-Kpn 19* after 96 h. The efficacy of fluopsin C is the same found in others studies with murine models using monotherapies or in combination of commercial antibiotics against *K. pneumoniae* KPC-producing (2, 19).

In addition, fluopsin C did not cause any changes in the glomerular corpuscles and, in the tubules was observed only a slight peeling of the epithelium lining them. Also, no changes in the Bowman´s space area and in the diameter of the proximal contorted tubule was observed. The results suggest that the fluopsin C did not show acute or chronic toxicity to the kidneys. However, fluopsin C increased number of hepatocytes with vacuolated cytoplasm and displaced nucleus. This change occurred when increase triglycerides production in hepatotoxicity disturber. This suggested that the antibiotic has moderate toxic on the liver in agreement with(14) and is observed until 40 days after administration of fluopsin C. Similarly, the antibiotics isoniazid, rifampin and pyrazinamide, commonly used in clinical therapy shows liver disturbance during the treatment in patients with tuberculosis, and is still used in combination to control

infection (20). Vancomycin is indicated to treat Gram-positive bacteria, but is not considered a first-choice agent because the adverse effects, such as hepatotoxicity, phlebitis and nephrotoxicity are common (21). In the same way, the intravenous formulation of colistin and polymyxin B were gradually abandoned in many countries in the early 1980's in spite of a high incidence of nephrotoxicity. However, the emergence of bacteria resistant to most of the classes of antibiotics available and the scarcity of new antimicrobial agents with activity against gram-negative microorganisms led to the reconstitution of polymyxins as a valuable therapeutic option (22).

In conclusion the relationship between the efficacies of fluopsin C in infected mice and show that fluopsin C is a promisor agent to use to control infection by Gram negative MDR. However, further studies need to be carry to identify molecular mechanism (remains unclear) by which fluopsin C is sepsis protective and the cytotoxicity (selectivity) and hepatotoxicity of the organocopper antibiotic compound should not be ignored.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Araucaria PPSUS, CNPq, CAPES for the financial support to this study (n° 472578 / 2012).

REFERENCES

1. Fair RJ, Tor Y. 2014. Perspectives in Medicinal Chemistry Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect Medicin Chem* 25–64.
2. Toledo PVM, Aranha AA, Arend LN, Ribeiro V, Zavascki AP, Tuon FF. 2015. Activity of antimicrobial combinations against KPC-2-producing *Klebsiella*

- pneumoniae in a rat model and time-kill assay. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4301–4304.
3. Ventola CL. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T A peer-reviewed J Formul Manag* 40:277–83.
 4. Stringer T, Seldon R, Liu N, Warner DF, Tam C, Cheng LW, Land KM, Smith PJ, Chibale K, Smith GS. 2017. Antimicrobial activity of organometallic isonicotinyl and pyrazinyl ferrocenyl-derived complexes. *Dalt Trans*.
 5. Itoh S, Inuzuka K, Suzuki T. 1970. New antibiotics produced by bacteria grown on n-paraffin (mixture of C12, C 13 and C14 fractions). *J Antibiot (Tokyo)* 23:542–545.
 6. Egawa Y, Umino K, Yukio I. 1971. ANTIBIOTIC YC 73 OF PSEUDOMONAS ORIGIN. IP STRUCTURE AND SYNTHESIS OF THIOFORMIN AND ITS CUPRIC COMPLEX (YC 73). *J Antibiot (Tokyo)* 225–226.
 7. Yoshiyuki Egawa, Kimio Umino, Shigemi Awataguchi, Yoshishige Kawano TO. 1970. ANTIBIOTIC YC 73 OF PSEUDOMONAS ORIGIN. PRODUCTION, ISOLATION AND PROPERTIES. *J Antibiot (Tokyo)* 267–270.
 8. Kerbauy G, Vivan ACP, Simões GC, Simionato AS, Pelisson M, Vespero EC, Costa SF, De CGT, Andrade J, Barbieri DM, Mello JCP, Morey AT, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, De Oliveira AG, Andrade G. 2016. Effect of a Metalloantibiotic Produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*. *Curr Pharm Biotechnol* 17:0–0.
 9. De Oliveira AG, Spago FR, Simionato AS, Navarro MOP, Da Silva CS, Barazetti AR, Cely MVT, Tischer CA, San Martin JAB, De Jesus Andrade CGT, Novello CR, Mello JCP, Andrade G. 2016. Bioactive organocopper compound from

- Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Front Microbiol* 7.
10. Rodríguez A, Villegas E, Montoya-Rosales A, Rivas-Santiago B, Corzo G. 2014. Characterization of antibacterial and hemolytic activity of synthetic pandinin 2 variants and their inhibition against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 9.
 11. de Souza PC, Morey AT, Castanheira GM, Bocate KP, Panagio LA, Ito FA, Furlaneto MC, Yamada-Ogatta SF, Costa IN, Mora-Montes HM, Almeida RS. 2015. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *J Microbiol Methods* 118:182–186.
 12. Otsuka H, Niwayama S, Tanaka H, Take T, Uchiyama T. 1972. An antitumor antibiotic, no. 4601 from *Streptomyces*, identical with YC 73 of *Pseudomonas* origin. *J Antibiot (Tokyo)* 25:369–370.
 13. Hedman R, Levenfors J, Stanislaw P, Welch CF, Daugherty S, Larsson RL, Gullbo J, Gerhardson B. 2004. Use of a known substance for the treatment of cancer and bacterial and fungal infections. Google Patents.
 14. Ma L-S, Jiang C-Y, Cui M, Lu R, Liu S-S, Zheng B-B, Li L, Li X. 2013. Fluopsin C induces oncosis of human breast adenocarcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin* 34:1093–100.
 15. Murate LS, Oliveira AG De, Higashi AY, Barazetti AR, Simionato AS, Santos C, Simões GC, Matheus I, Ferreira MR, Viviana M, Cely T, Octavio M, Navarro P, Freitas VF De, Nogueira MA, Carlos J, Mello P De, Pereira R, Jr L. 2015. Activity of Secondary Bacterial Metabolites in the Control of Citrus Canker 295–303.
 16. Desbois AP, Coote PJ. 2011. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): An in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *J Antimicrob*

- Chemother 66:1785–1790.
17. Luther MK, Arvanitis M, Mylonakis E, LaPlante KL. 2014. Activity of daptomycin or linezolid in combination with rifampin or gentamicin against biofilm-forming *Enterococcus faecalis* or *E. faecium* in an in vitro pharmacodynamic model using simulated endocardial vegetations and an in vivo survival assay using Gal. *Antimicrob Agents Chemother* 58:4612–4620.
 18. Das M, Sakha Ghosh P, Manna K. 2016. A Review on Platensimycin: A Selective FabF Inhibitor. *Int J Med Chem* 2016:1–16.
 19. Toledo PVM, Tuon FF, Bail L, Manente F, Arruda P, Aranha-junior AA. 2014. Modelo Experimental De Tratamento De Sepsis Por *Klebsiella Pneumoniae* Produtora De Betalactamase De Amplo Espectro. *Arq Bras Cir Dig* 27:168–171.
 20. ROSSOUW JE, SAUNDERS SJ. 1975. Hepatic Complications of Antituberculous Therapy. *QJM An Int J Med* 44:1–16.
 21. Bruniera FR, Ferreira FM, Savioli LRM, Bacci MR, Feder D, Pereira EC, Pedreira MLG, Peterlini MAS, Perazzo FF, Azzalis LA, Rosa PCP, Junqueira VBC, Sato MA, Fonseca FLA. 2014. Endothelial, renal and hepatic variables in wistar rats treated with vancomycin. *An Acad Bras Cienc* 86:1963–1971.
 22. Falagas ME, Kasiakou SK. 2005. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 40:1333–1341.

FIGURES AND LEGENDS

Fig. 1 – Cytotoxicity and Hemolytic analysis. Cells after 24 h of treatment with different concentrations of fluopsin C.

Fig. 2 – Effect of antibiotic on survival of *Tenebrio molitor* larvae (A) and mice (B). Treatment with different concentrations of fluopsin C in 8 days and 96 hours of observation, respectively.

Fig. 3 – Efficacy in an experimental infection murine model. Control (i) and 5 different Treatment (ii - vi) with fluopsin C in septicemia protection model using CRE-Kpn19. Survival is depicted 96 h after infection.

Fig. 4 – Micrograph of the liver of mice and mice after 10 days of treatment with fluopsin C or placebo. The control group (A and C) showed a slight vacuolization in the cytoplasm of hepatocytes (arrow) and discrete inflammatory infiltrate (asterisk). While treated with fluopsin C (B and D) presented moderate vessel congestion (cross), marked vacuolization of the cytoplasm (arrow), moderate inflammatory infiltrate (asterisk) and moderate hemorrhage (arrowhead). Similar images were observed in other fields and on all days. Color: H.E. Scale bar: 25 mm.

Fig. 5 – Box plots. (A) Area of 400 nucleus of hepatocytes, (B) area of 400 Bowman's space, (C) diameters of 200 proximal tubule and (D) diameters of 200 distal tubule. The median (-) and mean (+) of each treatment for the sums of the all times.

Fig. 6 – Photomicrograph of the renal cortex of mice and mice after 10 days of treatment with fluopsin C or placebo. The control group (A and C) has a discreet inflammatory infiltrate and mild hemorrhage in the glomerular corpuscles (arrows). In the tubules (C), discrete vacuolization of the cytoplasm could be observed and scaling is practically non-existent (asterisk). The animals in the treated group (B and D) had no glomerular changes (arrowheads). Already in the tubules (D), there was a discreet peeling of the tubular epithelium (asterisk). Similar images were observed in other fields and on other days. Color: H.E. Scale bar: 25 mm peeling of the tubular epithelium (asterisk). Similar images were observed in other fields and on other days. Color: H.E. Scale bar: 25 mm

TABLES

Table 1 – Qualitative analysis of the liver of mice at 1, 10, 20 and 40 days after treatment with 2mg/Kg of fluopsin C (T) or placebo (C)

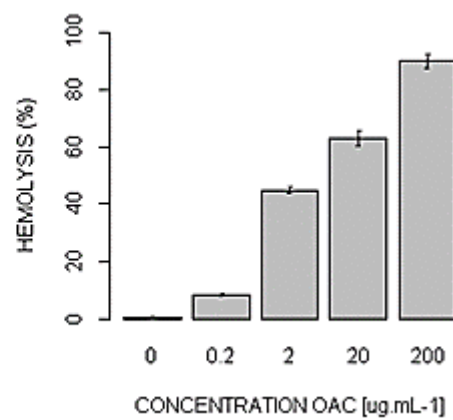
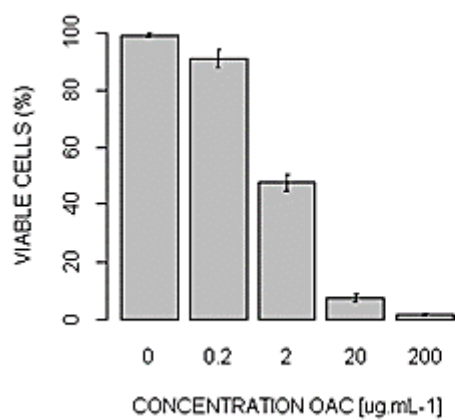
PARAMETER	SCORE							
	C1	T1	C10	T10	C20	T20	C40	T40
vessel congestion	0	1	0	3	0	2	0	2
cytoplasmic vacuolization	1	1	1	2	1	3	1	3
inflammatory infiltrate	1	2	1	2	1	1	1	2
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0
hemorrhage	0	3	0	0	0	2	0	2

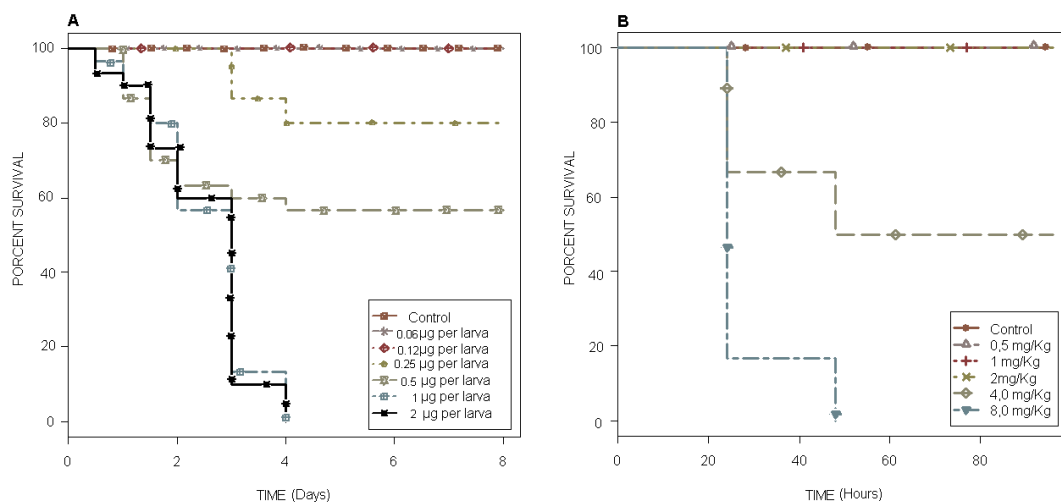
Table 2 – Quantification of hepatocytes with vacuolated cytoplasm and displaced nucleus (10 fields) of mice at 1, 10, 20 and 40 days after treatment with 2mg/Kg of fluopsin C (T) or placebo (C)

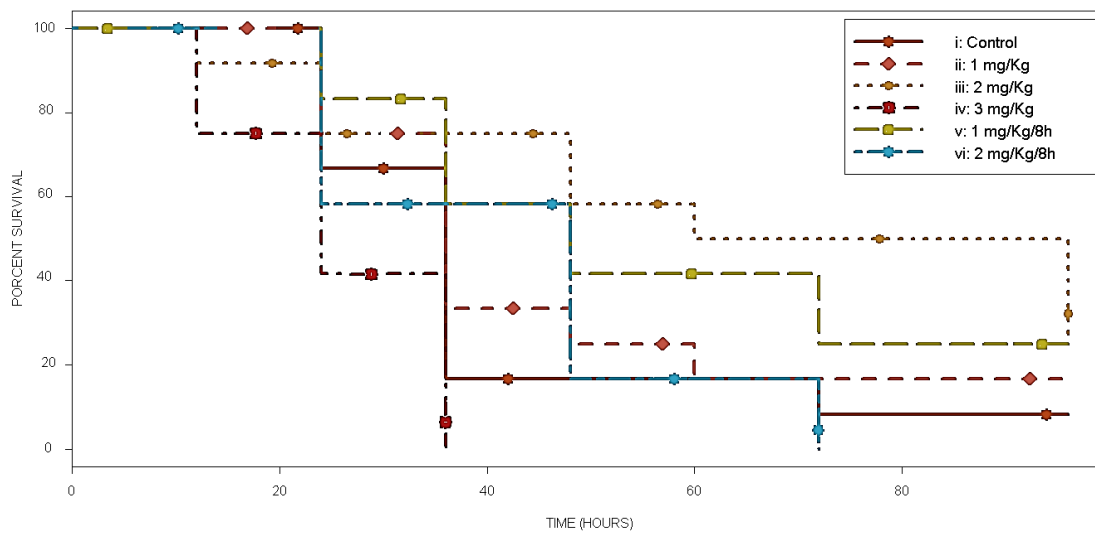
HEPATOCYTES WITH	QUANTIFICATION							
	C1	T1	C10	T10	C20	T20	C40	T40
1 nuclei	229	202	268	246	253	189	333	170
2 nucleus	15	11	17	47	16	33	36	42
Condensed Chromatin	35	40	28	48	35	8	39	45
Vacuolization	1	207	5	115	8	226	3	206

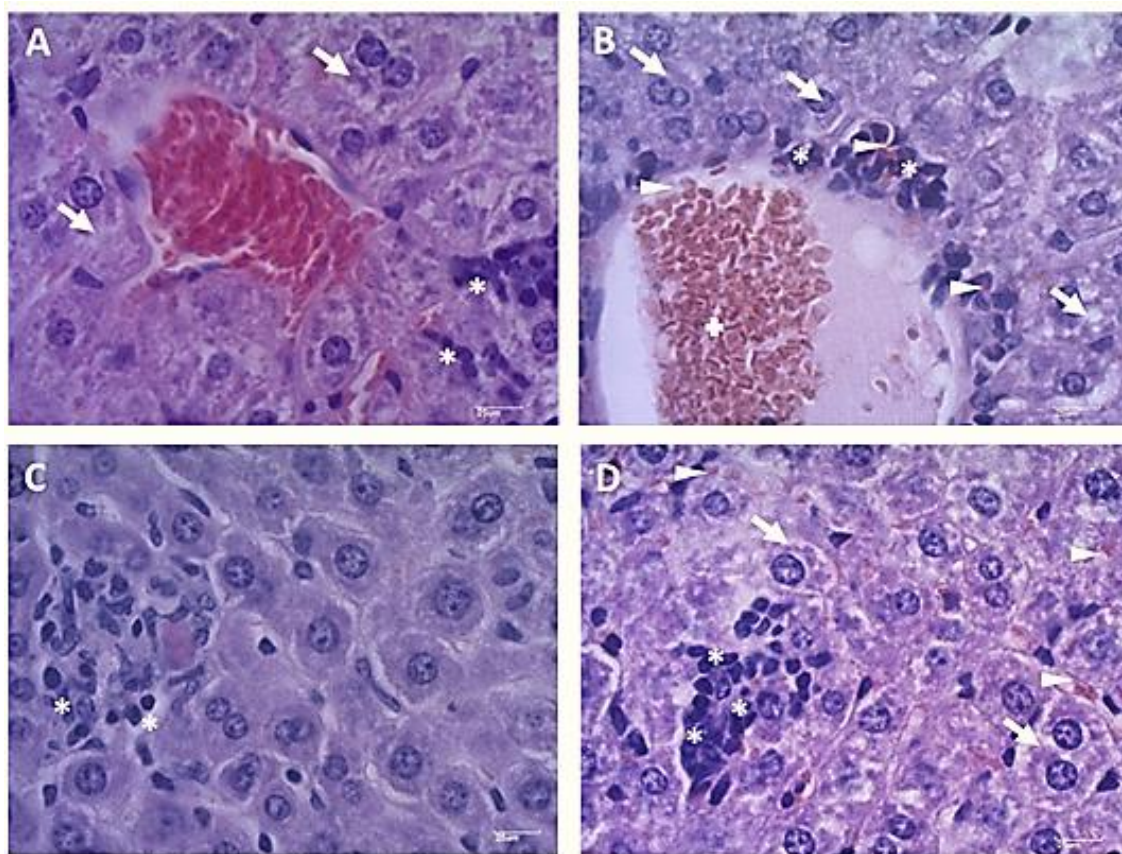
Table 3 – Qualitative analysis of the kidney of mice at 1, 10, 20 and 40 days after treatment with 2mg/Kg of fluopsin C (T) or placebo (C)

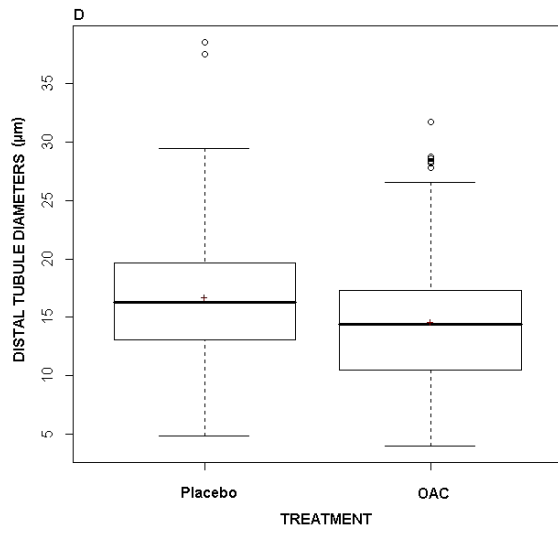
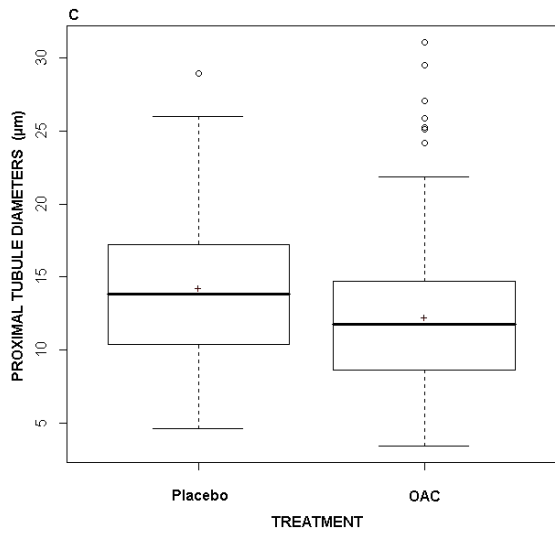
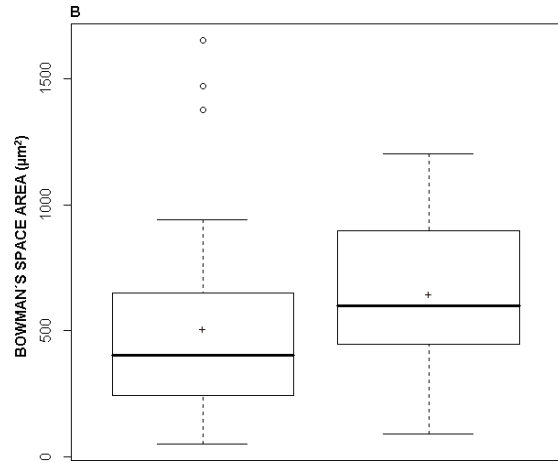
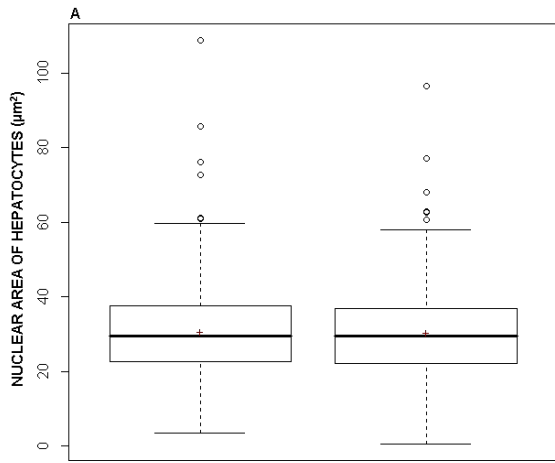
PARAMETER	SCORE							
	C1	T1	C10	T10	C20	T20	C40	T40
Congestion of capillaries	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0
Inflammatory infiltrate	1	1	1	1	1	1	1	1
Bleeding	1	1	1	1	1	1	1	1
Vacuolisation of the cytoplasm	1	2	1	1	1	1	1	3
Desquamation	0	1	1	1	0	1	1	1
Core position	M*	M	M	M	M	M	M	M

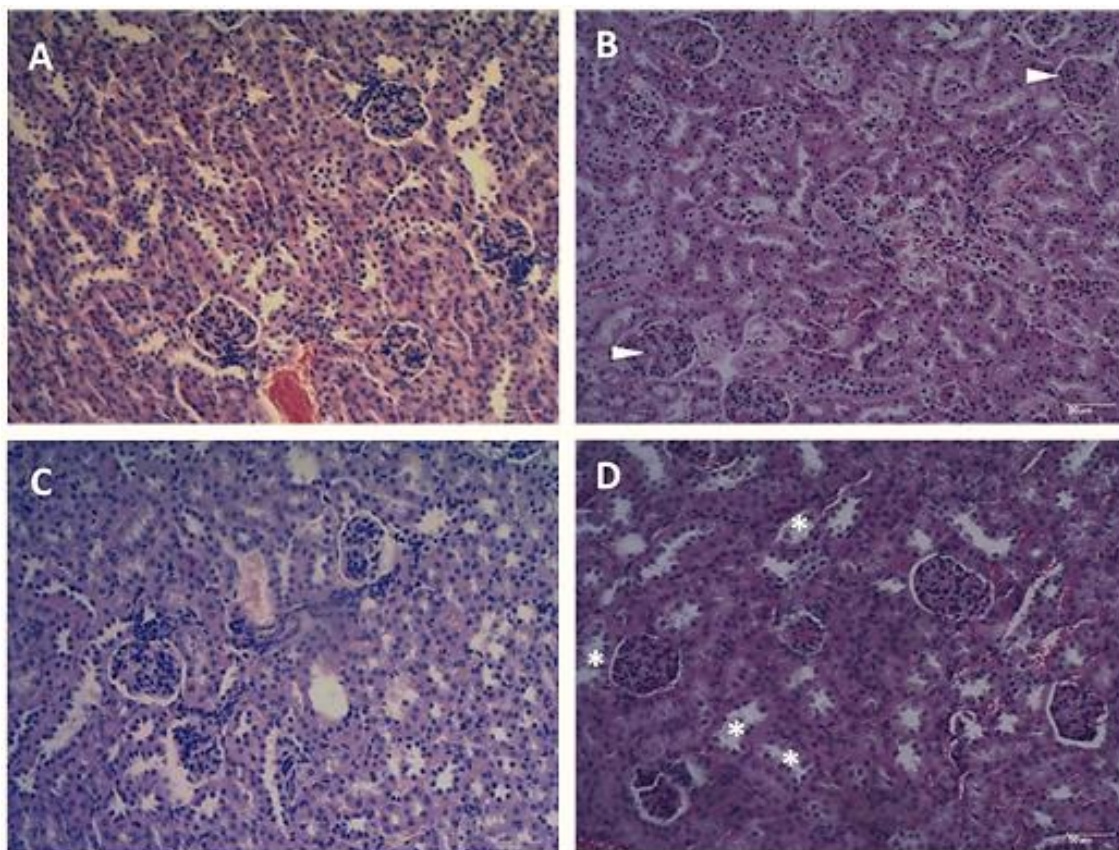












CONCLUSÃO

Este trabalho reuniu informação microbiológica, biotecnológica e farmacêutica para discutir o processo e dar uma visão geral dos métodos para descoberta, desenvolvimento e aprovação de compostos antimicrobianos. Ressaltando sempre a importância destas pesquisas e o esforço focado que se deve ter desde a descoberta até comercialização de um composto bioativo eficaz.

Foi desenvolvido um novo método de produção e purificação do composto antibiótico organometálico (OAC) produzido por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV. OAC foi identificado como fluopsina C, um potente bioativo que demonstrou alta atividade antibiótica com baixo risco de resistência. Embora a sua baixa seletividade e hepatotoxicidade, fluopsina C conseguiu aumentar a taxa de sobrevivência de camundongos infectados com KPC e não apresentou nefrotoxicidade.

Novas estratégias para melhorar a seletividade da substância e futuros estudos devem ser feitos para continuar avaliando a fluopsina C como um possível agente quimioterápico para infecções de difícil tratamento como as causadas por patógenos multirresistentes.