



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Atividade antimicrobiana de barbituratos sobre *Acinetobacter baumannii*

Mafalda Neto Soares

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotechnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof^a. Doutora Fernanda Domingues
Coorientadora: Doutora Susana Ferreira

Covilhã, outubro de 2017

Agradecimentos

Esta dissertação só pode ser concluída com a ajuda, disponibilidade e empenho das pessoas que me rodeiam, a quem gostaria de agradecer.

À Professora Fernanda Domingues, pela orientação e conhecimentos que transmitiu ao longo deste ano.

À Doutora Susana Ferreira pelo tempo e atenção disponibilizada, bem como cuidado em esclarecer todas as dúvidas que foram surgindo.

Ao Professor Paulo Almeida, ao Professor Samuel, à Joana Figueiredo e ao João Serrano por terem cedido os compostos que permitiram a realização deste trabalho.

À minha família e em particular aos meus pais por me terem apoiado, acompanhado e estarem presentes.

Aos meus amigos, em especial à Ana Luísa, Daniela, Diana, Vanessa e Rita pelo carinho, paciência e constante motivação, não me deixando desistir.

Aos colegas do Centro de Investigação em Ciências da Saúde e especial da sala de mestrado pelas constantes tardes de boa disposição.

À Joana Tomás pela disponibilidade que encontrou para doar amostras de sangue para este trabalho.

Ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde e à Universidade da Beira Interior por fornecer as condições necessárias para a realização do trabalho.

Obrigada a todos, sem vocês não teria sido possível terminar este trabalho.

Resumo

Atualmente tem-se vindo a assistir a um uso inadequado dos antibióticos, resultando num aumento de resistências bacterianas, sendo *Acinetobacter baumannii* uma dessas bactéria. Esta bactéria é ubíqua e é isolada com frequência de equipamentos e superfícies hospitalares, onde é motivo de preocupação. *A. baumannii* está associada a infeções como pneumonias, septicémias, infeções urinárias e infeções nosocomiais essencialmente do foro respiratório com particular incidência em doentes que necessitam de ventilação artificial. *A. baumannii* possui diversos fatores de virulência e patogenicidade, capacidade de manter a sua viabilidade por longos períodos de tempo o que permite que se mantenha em ambientes hospitalares devido à sua capacidade de formar biofilmes e resistir à dessecação. Para além disso é uma bactéria que frequentemente apresenta múltiplas resistências a antibióticos, tendo sido isoladas estirpes com resistências a todos os antibióticos conhecidos. Estas características de *A. baumannii* fazem com que esta bactéria se torne um alvo preferencial para estudo e desenvolvimento de novas terapias alternativas devido à problemática das resistências à maioria dos antibióticos atualmente comercializados. O ácido barbitúrico é um composto orgânico baseado no esqueleto heterocíclico da pirimidina, sendo considerado farmacologicamente inativo, ao passo que os seus derivados têm demonstrado possuir várias atividades biológicas, incluindo propriedades antibacterianas em algumas bactérias gram positivas e negativas. Os compostos de síntese derivados do ácido barbitúrico, nomeadamente compostos como 5-hidraziniletildenopirimidinas, podem ser assim uma alternativa promissora aos antibióticos convencionas. Assim, este trabalho teve como objetivos avaliar a potencial atividade antimicrobiana de seis compostos 5-hidraziniletildenopirimidinas, derivados do ácido barbitúrico, sobre *A. baumannii*, quer em células planctónicas quer em biofilmes, assim como estudar o mecanismo de ação e potencial atividade hemolítica destes compostos neste microrganismo. Os resultados sugerem que as estirpes estudadas são suscetíveis aos compostos derivados do ácido barbitúrico com valores de concentração mínima inibitória entre 2 e > 32 µg/mL, sendo que estes têm um efeito bacteriostático em *A. baumannii*. Para além disso, a combinação dos compostos com os antibióticos tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina e gentamicina pode promover uma redução na concentração mínima inibitória dos antibióticos. Também foi evidenciado que os compostos não clivam ao ADN bacteriano, não inibem as bombas de efluxo e não inibem o processo de *quorum-sensing*, no entanto diminuem a motilidade bacteriana e inibem a formação de biofilmes. Estes compostos não apresentam capacidade hemolítica, indicando que não são citotóxicos para os eritrócitos humanos. Assim, os compostos de síntese derivados do ácido barbitúrico mostraram potencialidades *in vitro* promissoras para o controlo de infeções, redução da resistência aos antibióticos e inibição da formação de biofilmes bacterianos, podendo ter por

isso potencial uso como agentes terapêuticos contra este microrganismo, com a particularidade de não apresentarem citotoxicidade em eritrócitos humanos.

Palavras-Chave

Acinetobacter baumannii, resistências, compostos sintéticos, ácido barbitúrico, atividade antibacteriana.

Abstract

Nowadays we have been assisting to an inadequate use of antibiotics, resulting in an increase of bacterial resistance, being *Acinetobacter baumannii* one of these cases. It is a ubiquitous bacterium, frequently isolated from equipment and surfaces from hospitals, where it has become subject of concern. *A. baumannii* is related with infections like pneumonias, septicaemias, urinary tract infections and nosocomial infections, especially respiratory stream infections in patients that need artificial ventilation. *A. baumannii* has several virulence and pathogenic factors, such as ability to maintain its viability for long periods of time that allow it to remain in hospital environment due to its capacity of biofilm formation and to resist dryness. This bacterium presents resistance to several antibiotics, and some of the isolated strains have been reported to be resistant to all known antibiotics. These *A. baumannii*'s characteristics makes this bacterium a target to the study and development of new alternative therapies due to the resistance to the majority of antibiotics being commercialized. Barbituric acid is an organic compound based on the pyrimidine heterocyclic skeleton, and it is pharmacological inactive, while its derivatives have several biological activities. The synthetic compounds derivate from barbituric acid, like 5-hidrazinylethylidenpyrimidines, could be promising alternatives to conventional antibiotics. In this work, the potential antibacterial effect of six compounds 5-hidrazinylethylidenpyrimidines derivate from barbituric acid was evaluated against *A. baumannii*, either in planktonic cells or biofilm formation, quorum-sensing inhibition and bacterial motility. It was also studied the potential modulation of antibiotics' resistance by the compounds in study, the potential efflux pump inhibition, DNA cleavage and hemolytic activity. Results suggest that the studied strains are susceptible to the synthetic compounds derivate from barbituric acid with minimum inhibitory concentration (MIC) ranging 2 to > 32 µg/mL. The studied compounds showed to have a bacteriostatic effect in *A. baumannii*. It was also possible to observe that the compounds do not cleave bacterial DNA, do not inhibit efflux pumps nor the quorum-sensing process. Also, the evaluated compounds have not shown hemolytic capacity, therefore they are not toxic to human erythrocytes. However, they reduce bacterial motility and inhibit biofilm formation. Besides this, the combination of the compounds with tetracycline, erythromycin, chloramphenicol, ciprofloxacin and gentamycin promote a reduction in the antibiotic MIC. With this, synthetic compounds derivate from barbituric acid studied here show promising *in vitro* applications in the control of infections, antibiotic resistance reduction and inhibition of bacterial biofilm formation. Thus, it could be possible to apply these compounds as antibacterial agents against this bacterium, with the advantage of lack of cytotoxicity against human erythrocytes.

Keywords

Acinetobacter baumannii, resistances, synthetic compounds, barbituric acid, antibacterial activity.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - <i>Acinetobacter baumannii</i>	2
2.1. Taxonomia e características gerais.....	2
2.2. Epidemiologia e disseminação.....	3
2.3. Fatores de virulência e patogenicidade	5
2.3.1. Fatores gerais de virulência	6
2.3.2. Exopolissacarídeos e Lipopolissacarídeos (LPS)	6
2.3.3. Fosfolipases, Proteínas de Ligação à Penicilina (PBP) e Proteases	7
2.3.4. Porinas e proteína OmpA.....	7
2.3.5. Biofilmes	8
2.3.6. Sideróforos e Vesículas da Membrana Externa	10
2.4. Resistências antimicrobianas e mecanismos de resistência.....	11
2.4.1. Mecanismo geral dos antibióticos.....	12
2.4.2. Alteração dos alvos de ação dos antibióticos.....	13
2.4.3. Bombas de efluxo.....	14
2.4.4. Alteração da permeabilidade membranar	15
Capítulo 3 - Estratégias de controlo de <i>Acinetobacter baumannii</i>	16
3.1. Terapias antibióticas.....	16
3.2. Terapias não antibióticas	19
3.3. Barbituratos e derivados do ácido barbitúrico	21
Capítulo 4 - Objetivos.....	23
Capítulo 5 - Materiais e Métodos	24
5.1. Microrganismos.....	24
5.1.1. Condições de armazenamento e crescimento das estirpes	24
5.2. Codificação e Estrutura dos Compostos	25

5.3.	Equipamento	27
5.4.	Reagentes.....	28
5.5.	Ensaio de atividade antibacteriana	29
5.5.1.	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)	29
5.5.2.	Ensaio de curvas de morte de células planctónicas com os compostos em teste ...	30
5.5.3.	Clivagem do plasmídeo pUC 18-K2 pelos compostos em teste	30
5.5.4.	Ensaio de acumulação de brometo de etídeo	31
5.5.5.	Modulação da resistência dos antibióticos.....	32
5.5.6.	Avaliação da inibição do mecanismo de <i>Quorum-sensing</i>	32
5.5.7.	Avaliação do swimming bacteriano na presença dos compostos em teste	33
5.5.8.	Avaliação do efeito dos compostos em teste na inibição da formação de biofilmes 33	
5.5.9.	Avaliação da atividade hemolítica dos compostos em teste.....	34
Capítulo 6 -	Resultados e Discussão	36
6.1.	Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos de síntese derivados do ácido barbitúrico	36
6.2.	Ensaio de curvas de morte de células planctónicas com os compostos em teste.....	40
6.3.	Clivagem do plasmídeo pUC 18-K2 pelos compostos em teste	46
6.4.	Ensaio de acumulação de brometo de etídeo	47
6.5.	Modulação da resistência de antibióticos	48
6.6.	Avaliação da inibição do processo de <i>Quorum-sensing</i>	50
6.7.	Avaliação do swimming bacteriano na presença dos compostos em teste	51
6.8.	Avaliação do efeito dos compostos em teste na inibição da formação de biofilmes ..	53
6.9.	Avaliação da atividade hemolítica dos compostos.....	55
Capítulo 7 -	Conclusões e Perspetivas Futuras	58
Capítulo 8 -	Referências Bibliográficas	60

Lista de Figuras

Figura 1: Biologia da bactéria <i>Acinetobacter baumannii</i> : fatores de virulência e patogenicidade bacteriana, mecanismos de resistência e opções de tratamento da infecção (Adaptado de Lee <i>et al.</i> , 2017a).	5
Figura 2: Diferentes mecanismos de resistência a antibióticos encontrados em bactérias Gram-negativas (Adaptado de Fernandes, Amador and Prudêncio, 2013).	12
Figura 3: Estrutura da molécula de ácido barbitúrico.	21
Figura 4: Curvas de morte para a estirpe de <i>A. baumannii</i> LMG 1025, para os compostos de síntese (a) JF20, (b) JF22 e (c) JF24.	42
Figura 5: Curvas de morte para a estirpe de <i>A. baumannii</i> AcB 13/10 para os compostos de síntese (a) JF20, (b) JF22 e (c) JF24.	43
Figura 6: Curvas de morte para a estirpe de <i>A. baumannii</i> AcB 73/10, para os compostos de síntese (a) JF20, (b) JF22 e (c) JF24.	45
Figura 7: Clivagem do plasmídeo pUC 18-K2 pelos Compostos JF20 (a), JF22 (b), JF24 (c) e controle de DMSO, pADN 37 °C e pADN 4°CADN (d).	46
Figura 8: Resultados do ensaio de acumulação de BrEt para a estirpe de <i>A. baumannii</i> LMG 1025.	48
Figura 9: Halos de inibição de crescimento bacteriano e de produção de violaceína para o Resveratrol e dos compostos JF20, JF22 e JF24 em estudo.	50
Figura 10: Resultados do ensaio de inibição de formação de biofilmes pelos compostos teste para as estirpes de <i>A. baumannii</i> LMG 1025 (a), AcB 13/10 (b) e AcB 73/10 (c).	55
Figura 11: Estrutura dos compostos (a) JF20, (b) JF22 e (c) JF26.	57

Lista de Tabelas

Tabela 1: Resumo dos agentes antimicrobianos.	25
Tabela 2: Denominação, estrutura química e respectiva codificação aplicada neste trabalho dos compostos utilizados.	26
Tabela 3: Lista dos equipamentos utilizados para os ensaios.	27
Tabela 4: Lista de reagentes utilizados nos ensaios.	28
Tabela 5: Resultados das CMI's dos antibióticos tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina e polimixina B para as estirpes de <i>A. baumannii</i> em estudo.	37
Tabela 6: Valores de CMI's obtidos dos compostos estudados para <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cereus</i> e estirpes de <i>A. baumannii</i>	39
Tabela 7: Tabela resumo do ensaio de modulação com os compostos JF20, JF22 e JF24.	49
Tabela 8: Atividade anti-QS dos compostos em estudo e resveratrol, usando <i>C. violaceum</i> ATCC 12472.	51
Tabela 9: Resumo do ensaio de motilidade de <i>A. baumannii</i>	52
Tabela 10: Resultados do ensaio de atividade hemolítica dos compostos em teste.	56

Lista de Acrónimos

AHL	Acil Homoserinas Lactonas
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
DO	Densidade Ótica
EPI	Inibidor de bombas de efluxo, do inglês <i>Efflux Pump Inhibitor</i>
BrEt	Brometo de Etídeo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetracetic acid</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LB	Luria-Bertani
OMS	Organização Mundial de Saúde
OMV	Vesículas de membrana externa, do inglês <i>Outer Membrane Vesicles</i>
PBP	Penicillin-Binding Proteins
PABN	Fenilalanina-arginina β -naftilamida, do inglês <i>phenylalanine-arginine β-naphthylamide</i>
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
QS	<i>Quorum-Sensing</i>
rpm	Rotações Por Minuto
Tlr	<i>Toll-Like Receptor</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UCI	Unidade de Cuidados Intensivos
ufc	Unidades formadoras de colónias

Capítulo 1 - Introdução

Atualmente tem-se vindo a assistir a um crescente problema de saúde pública, devido ao rápido desenvolvimento de resistências antimicrobianas por parte de um grande número de microrganismos, onde se pode incluir algumas espécies pertencentes ao género *Acinetobacter*. Segundo a “Lista de Prioridade Global para Orientar a Pesquisa, Descoberta e Desenvolvimento de Novos Antibióticos para Bactérias Resistentes” disponibilizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a espécie *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenemos é considerada como sendo um microrganismo patogénico de prioridade de nível 1 ou crítica, (Tacconelli *et al.*, 2017) o que é um indicativo da extrema necessidade de desenvolvimento novas terapêuticas.

A problemática das resistências microbianas é, a nível hospitalar, algo que necessite de uma atenção redobrada uma vez que as populações se encontram cada vez mais envelhecidas o que, por sua vez, é sinónimo de um acréscimo de doenças crónicas, pacientes com imunidades comprometidas e maiores tempos de permanência em Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Segundo artigos que datam desde 1970, pneumonias adquiridas em ambiente hospitalar continuam a ser a forma mais frequente de infeção por *A. baumannii*, mas infeções no sistema nervoso central, cutâneas e tecidos moles, bem como ósseos têm vindo a aumentar exponencialmente nos últimos anos (Anton Y Peleg, Seifert and Paterson, 2008).

Uma vez que a bactéria *A. baumannii* é um patogénico oportunista, com vários mecanismos de resistência a múltiplos antibióticos, capacidade de adquirir novas características de resistência e de sobreviver em ambientes hospitalares por longos períodos de tempo (Rice, 2006; Perez *et al.*, 2007), as infeções nosocomiais causadas por esta bactéria são algo frequente e motivo de preocupação, pelo que há a necessidade de desenvolver novos agentes com propriedades antimicrobianas que quer por administração isolada ou conjunta, permitam reduzir este tipo de infeções.

Capítulo 2 - *Acinetobacter baumannii*

2.1. Taxonomia e características gerais

O género *Acinetobacter*, nos últimos 30 anos tem vindo a sofrer alterações taxonómicas de elevada relevância. Para além disso, a espécie *Acinetobacter baumannii*, tem vindo a emergir como um dos patogénicos mais problemáticos à escala global. A sua relevância clínica, principalmente nos últimos 15 anos, tem sido impulsionada pela sua grande capacidade de regular e adquirir resistências, tornando-o num dos microrganismos clinicamente ameaçadores nesta era atual dos antibióticos (Joly-Guillou, 2005). Na edição de 1974 do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, o género *Acinetobacter* foi identificado com a descrição de espécie única, *Acinetobacter calcoaceticus*. Por sua vez, na “*Approved List of Bacterial Names*”, foram adicionadas duas espécies, *A. calcoaceticus* e *A. lwoffii*, tendo por base a observação de que algumas espécies são capazes de produzir ácidos a partir da glucose, enquanto outras não. Tendo por base esta mesma característica, outras literaturas subdividiram *A. calcoaceticus* em duas subespécies, sendo estas *A. calcoaceticus* *bv.* *Anitratrus* (formalmente denominada *Herellea vaginicola*) e *A. calcoaceticus* *bv.* *Lwoffii* (formalmente denominada *Mima polymorpha*), mas estas designações nunca foram aprovadas por taxonomistas (Juni, 1978; Anton Y Peleg, Seifert and Paterson, 2008).

O género *Acinetobacter* pertence ao filo *Proteobacteria*, ordem *Gammaproteobacteria* e família *Moraxellaceae* (Juni, 1978; Giamarellou, Antoniadou and Kanellakopoulou, 2008; Chusri *et al.*, 2009; Martins and Barth, 2013; Nowak and Paluchowska, 2016b). Este género é constituído por microrganismos Gram-negativos, de forma cocobacilar, aeróbios estritos, que não realizam fermentação, não móveis, catalase positivos, oxidase negativos e com uma percentagem de GC entre 39 e 47%. O género *Acinetobacter* spp. possui 31 espécies distintas, sendo que 10 destas foram recentemente adicionadas e 3 espécies (*A. parvus*, *A. schindleri*, e *A. ursingii*) têm origem humana (Giamarellou *et al.* 2008; Peleg *et al.* 2008; Martins & Barth 2013). Este género é possuidor de uma grande versatilidade nutricional, bem como metabólica, podendo por isso adaptar-se com facilidade a diferentes condições ambientais. Deste modo, têm sido encontradas e isoladas com facilidade várias espécies provenientes do solo, água, amostras de vegetais e animais, bem como de amostras cutâneas e trato gastrointestinal provenientes de seres humanos saudáveis. Em ambiente hospitalar também são isoladas a partir de diversos equipamentos, bancadas, sistemas de ventilação e circulação de ar, sendo que as espécies mais frequentemente encontradas são *A. baumannii*, *A. johnsonii* e *A. radioresistens* (Dijkshoorn *et al.* 2007; Giamarellou *et al.* 2008).

A célula de *A. baumannii* possui uma parede celular rígida que lhe confere a sua morfologia típica de cocobacilos e proteção contra lise. A célula de *A. baumannii* é constituída por nucleoide, em que o seu ADN cromossomal se encontra na forma superenrolado e possui ADN plasmídico onde se encontram a maioria dos genes associados às resistências (Prescott, 2002).

Todas as estirpes de *A. baumannii* são apenas capazes de crescer em condições aeróbias, incapazes de reduzir nitratos a nitritos, são capazes de usar diversos produtos orgânicos tais como açúcares, ácidos gordos, álcoois alifáticos, ácidos dicarboxílicos, alguns aminoácidos, hidrocarbonetos alifáticos, bem como muitos compostos aromáticos e alicícos como fonte de carbono e energia. Através da examinação por microscopia eletrónica de uma amostra de *Acinetobacter* corada negativamente e finamente seccionada verificou-se que este possui um invólucro constituído por múltiplas camadas: uma membrana externa, uma camada fina de peptidoglicano, uma membrana citoplasmática e uma cápsula. A membrana externa é essencialmente constituída por fosfolípidos no folheto interno e lipopolissacáridos no folheto externo. Nesta camada é onde se encontram as porinas que são proteínas transportadoras. A célula de *A. baumannii* possui ainda uma cápsula que é de natureza polissacarídea e pode ser visualizada microscopicamente quer positivamente por coloração da cápsula diretamente, quer negativamente pelo método de tinta-da-china que cora tudo o que se encontra à volta da célula, ficando um halo. Esta estrutura confere proteção à célula contra a dessecação. A bactéria possui ainda, durante a fase de crescimento exponencial *fimbriae* que lhe possibilita alguma mobilidade e adesão às superfícies. (Henriksen, 1973; Juni, 1978).

2.2. Epidemiologia e disseminação

A. baumannii é uma bactéria ubíqua e pode, por isso, ser encontrada em solos onde realiza a mineralização de compostos aromáticos, em superfícies de objetos onde forma biofilmes e na pele, sendo considerado um importante patogénico oportunista (Juni 1978; Gerner-Smidt et al. 1991; Nowak & Paluchowska 2016). Esta bactéria tem a capacidade de crescer numa larga gama de temperaturas e pH, possui uma elevada resistência a desinfetantes e antissépticos, bem como a capacidade de formar biofilmes em superfícies abióticas como cateteres e implantes ou superfícies bióticas (Duarte, Ferreira, *et al.*, 2016; Nowak and Paluchowska, 2016b).

A. baumannii é uma espécie que apresenta uma grande relevância clínica, devido ao seu frequente isolamento em superfícies e materiais hospitalares, bem como exsudados dos pacientes. *A. baumannii* possui diversos fatores de virulência e capacidade de manter a sua viabilidade por longos períodos de tempo em superfícies secas, possui a capacidade de adquirirem nutrientes essenciais,

facilidade de adesão a células epiteliais provocando a sua apoptose e a secreção de enzimas que danificam os tecidos (Martins and Barth, 2013).

A. baumannii pode causar um grande número de infecções, tais como pneumonias, septicemias, infecções urinárias (Martins and Barth, 2013), bem como infecções nosocomiais, essencialmente do foro respiratório com particular incidência em doentes que necessitam de ventilação artificial. A bactéria está também relacionada com infecções cutâneas, endocardites, meningites e osteomielites (Wieczorek *et al.*, 2008; Srinivasan *et al.*, 2015; Greig and Scott, 2016), ou seja, em pessoas cujo sistema imunitário se encontra comprometido, quer devido a terem sido submetidos a grandes cirurgias, terem sofrido traumas, recém-nascidos prematuros, idosos ou ainda por terem sido sujeitos a longos períodos de hospitalização que requeiram que o doente seja ventilado ou intubado com cateteres intravasculares, de drenagem ou urinários. A duração dos processos invasivos, bem como a exposição a uma larga escala de antibióticos foram também identificados como sendo fatores de risco para a aquisição de infecções por *Acinetobacter* spp., assim como a transmissão da bactéria entre mãos e superfícies hospitalares (Nowak and Paluchowska, 2016b). Esta bactéria é responsável por 2 a 10% de todas as infecções provocadas por bactérias Gram-negativas contraídas em meio hospitalar, com facilidade de propagação entre doentes, principalmente em pacientes internados em UCI (Joly-Guillou, 2005; Nowak and Paluchowska, 2016b).

Em ambientes hospitalares, a ocorrência de bacterémias é atualmente a principal causa de morte por infecções, sendo que, segundo um estudo realizado pela Agência Europeia do Medicamento (do inglês, *European Medicines Agency - EMA*), a maioria dos pacientes que sofriam com bacterémia causadas por *Acinetobacter* spp. possuíam idade superior a 50 anos, havendo uma prevalência do sexo masculino. Destes casos, 5% foram hospitalizados em unidades de cuidados gerais, enquanto 54% foram internados em unidades de cuidados intensivos (Joly-Guillou, 2005). Foi também reportado em outro estudo, casos de sépsis e/ou choque séptico em 19% dos casos de bacterémias causadas por *Acinetobacter* spp. Com isto, torna-se evidente a elevada patogenicidade de algumas estirpes desta bactéria, com uma taxa de mortalidade que ronda entre os 19% a 50% (Srinivasan *et al.*, 2015), muito devido ao atraso ou à incapacidade de se encontrar uma terapia adequada. Por outro lado, casos de bacterémias mistas são frequentes neste microrganismo, justificando-se, por isso, o estudo de possíveis casos de sinergismo entre *Acinetobacter* spp. e outras bactérias (Joly-Guillou, 2005).

Acinetobacter baumannii, uma vez que é uma bactéria Gram-negativa, possui na constituição da sua membrana exterior moléculas de lipopolissacáridos (LPS) que funcionam como uma endotoxina. Estas moléculas atuam como indutoras do sistema inflamatório, levando ao desenvolvimento da síndrome do choque tóxico e ao desenvolvimento de septicemias que são muitas vezes fatais (Bhargava, Sharma and Capalash, 2010; Longo, Vuotto and Donelli, 2014). Os LPS estão também

envolvidos na resistência bacteriana no soro humano e atua de forma sinérgica com o exopolissacárido capsular através de uma ação bactericida no soro humano e bloqueio do acesso das células do sistema imunitário às células bacterianas, prevenindo ativação de vias alternativas de combate à infecção (Joly-Guillou, 2005).

2.3. Fatores de virulência e patogenicidade

A bactéria *A. baumannii* possui diversos fatores de virulência, bem como mecanismos de resistência a antibióticos e outros fármacos, tal como se evidencia de uma forma resumida na Figura 1. Estes serão abordados nos tópicos seguintes de uma forma mais explicativa.

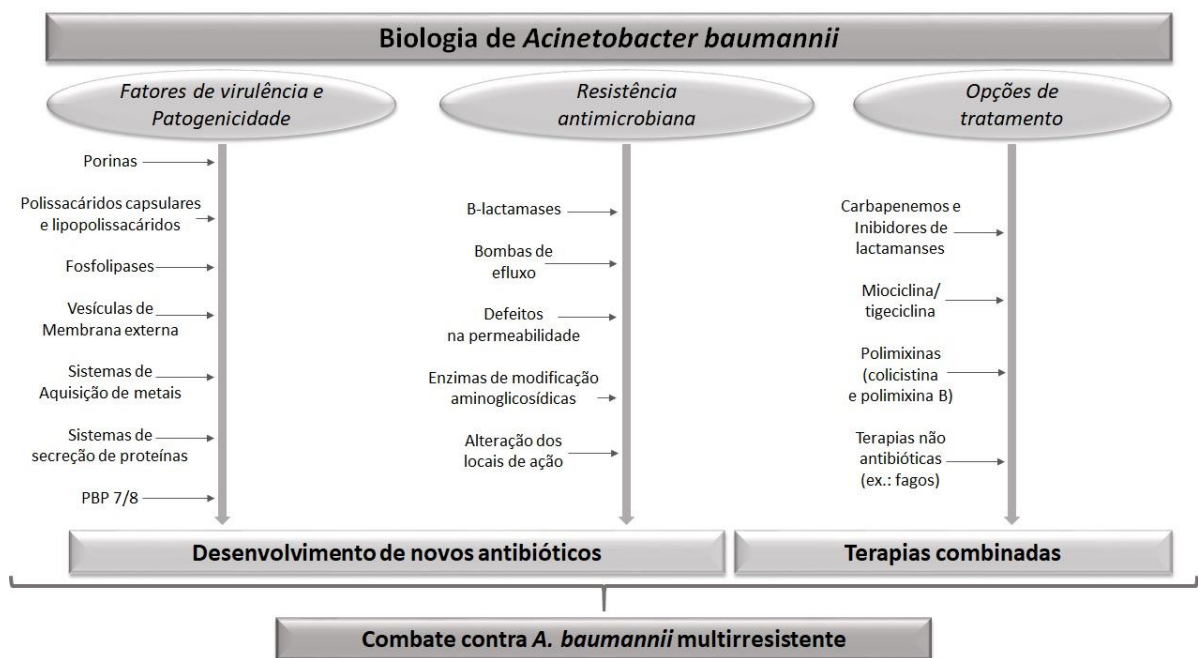


Figura 1: Biologia da bactéria *Acinetobacter baumannii*: fatores de virulência e patogenicidade bacteriana, mecanismos de resistência e opções de tratamento da infecção (Adaptado de Lee et al., 2017a).

2.3.1. Fatores gerais de virulência

A. baumannii é uma bactéria que possui vários mecanismos de sobrevivência em condições adversas e de stress. Isto deve-se ao facto desta bactéria possuir a uma versatilidade nas suas necessidades de crescimento, sobrevivência (ex.: larga gama de pH e temperatura), facilidade de adquirir nutrientes essenciais do meio, bem como a capacidade de adquirir diversos genes que lhe conferem vantagens adaptativas. Estes genes podem conferir as mais variadas características à bactéria, tais como a capacidade de resistência à dessecação permitindo-lhe manter a sua viabilidade por longos períodos de tempo e genes de resistências a antibióticos, Para além da habilidade que *A. baumannii* tem de adquirir estes fatores de resistência, esta possui ainda motilidade e capacidade de produzir em excesso transportadores de membrana, contribuindo tudo para o aumento do fenótipo de resistências aos antibióticos destas bactérias (Srinivasan *et al.*, 2015).

2.3.2. Exopolissacáridos e Lipopolissacáridos (LPS)

No passado, *Acinetobacter baumannii* era considerada uma bactéria com reduzida virulência, enquanto que agora se sabe *A. baumannii* possui a capacidade de produzir exopolissacáridos e LPS localizados na membrana externa da parede. A expressão dos exopolissacáridos é regulada por um *cluster* de genes, sendo que alguns dos genes que constituem este *cluster* são genes essenciais para o crescimento num exsudado inflamatório, pois estão associados à formação da cápsula bacteriana. (Koeleman *et al.*, 2014; Ghosh *et al.*, 2016). Por outro lado, mutações nos genes responsáveis pela síntese de O-pentassacáridos constituintes de glicoproteínas capsulares, atenuam a letalidade em modelos animais, promovendo ainda um desenvolvimento anormal e incompleto das estruturas dos biofilmes bacterianos (Russo *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2017a). Adicionalmente verificou-se ainda que estirpes que possuíam uma deficiência na cápsula, eram eliminadas completamente dos tecidos moles ao fim de 24 horas de inflamação, o que pode indicar que esta estrutura desempenha um papel importante na proteção da bactéria do sistema imunitário do hospedeiro (Luke *et al.*, 2010; McConnell, Actis and Pachón, 2013).

Por sua vez os LPS são constituídos por lípido A, um centro de hidratos de carbono e o respetivo antigénio-O. O papel dos LPS no processo de patogenicidade bacteriana é prolongar o tempo de vida da bactéria no soro e nos tecidos moles, sendo também importante para que ocorra a deteção e ativação do sistema imunitário via recetores CD14 e TLR-4 (do inglês *Toll-Like Receptor 4*) nas vias respiratórias e pulmões. Por sua vez, a inibição da enzima envolvida a síntese do lípido A, suprime a ativação do sistema imunitário, mais em concreto dos macrófagos e promove a *clearance*

de *A. baumannii* através de uma fagocitose mais eficaz da bactéria, que, juntamente com a redução da expressão do LPS, reduz o desenvolvimento de inflamação em modelos murínicos. Estes resultados indicam que o bloqueio da síntese de LPS é um possível caminho aquando do desenvolvimento de novas terapias, pois modificações a este nível contribui para uma redução da resistência antimicrobiana, aumentando a eficácia da terapêutica atual de antibióticos, incluindo a colistina (Luke *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2017a).

2.3.3. Fosfolipases, Proteínas de Ligação à Penicilina (PBP) e Proteases

As fosfolipases bacterianas são enzimas lipolíticas que catalisam a degradação de glicerofosfolípidos. Pensa-se que contribuem para a patogénese de bactérias Gram-negativas por clivagem dos fosfolípidos das células da mucosa do organismo hospedeiro, provocando a sua lise e facilitando a sua internalização. Supõe-se ainda que a fosfolipase D contribui para a disseminação de *A. baumannii* a partir dos pulmões para o coração do hospedeiro (McConnell, Actis and Pachón, 2013).

A. baumannii produz proteínas de ligação à penicilina (PBP - do inglês *Penicillin-Binding Proteins*) que são alvo da penicilina e antibióticos β -lactâmicos. Uma vez que estes antibióticos inibem a formação da parede celular, a sua inibição pelas PBP contribui para uma maior a estabilidade da célula bacteriana (McConnell, Actis and Pachón, 2013).

Para além da capacidade de produção de fosfolipases e PBP, *A. baumannii* tem ainda a capacidade de sintetizar proteases. Estas hidrolisam as ligações peptídicas de proteínas estruturais e funcionais do hospedeiro, bem como as proteínas secretadas pelo sistema imunitário. Para além disso, são necessárias para que a bactéria sobreviva no soro humano, promovendo também a formação de biofilmes (Weber *et al.*, 2017).

2.3.4. Porinas e proteína OmpA

As porinas são proteínas localizadas na membrana externa associadas com a alteração da permeabilidade celular. Uma das porinas mais frequentes em *A. baumannii* é a porina OmpA, cuja organização em folhas β , formando um canal que atravessa a membrana e constitui um dos fatores de virulência de *A. baumannii*. A sua presença induz a apoptose em células epiteliais humanas, por

libertação de moléculas como citocromo c do interior das mitocôndrias e o fator indutor de apoptose (Choi *et al.*, 2005; McConnell, Actis and Pachón, 2013). Foi ainda verificado que a proteína OmpA consegue translocar-se para o núcleo, onde induz a célula à morte. Tem ainda a capacidade de conferir adesão e facilitar invasão das células epiteliais através da interação com a fibronectina, ligando-se ao fator H do soro humano, impedindo a liberação do complemento mediador de morte (Choi *et al.*, 2008). Para além disso a porina OmpA está envolvida diretamente na resistência antimicrobiana de *A. baumannii*, uma vez que através da rutura do gene *ompA* que codifica para esta porina, há uma diminuição significativa do valor de Concentração Mínima Inibitória (CMI) de diversos antibióticos tais como o cloranfenicol, aztreonam e o ácido nalidíxico. Isto sugere que esta porina participa na extrusão dos antibióticos do espaço periplasmático para a membrana exterior, funcionando em conjunto com as bombas de efluxo. Por fim, verificou-se ainda que OmpA promove a sobrevivência e a persistência de *A. baumannii*, uma vez que promove a formação de biofilmes e ainda regula a formação das vesículas na membrana externa (Choi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2017a).

2.3.5. Biofilmes

A adesão das células de *A. baumannii* às células epiteliais e da mucosa através de polissacarídeos capsulares ou fímbriae, é um fator determinante para que ocorra a colonização das células hospedeiras de pacientes suscetíveis. Segundo um estudo realizado, a maioria das estirpes de *A. baumannii* possuem propriedades de adesão às células hospedeiras, sendo tal possível de se verificar por ensaios de hemaglutinação. Por sua vez, a adesão de *A. baumannii* está diretamente relacionado com o risco de desenvolvimento de epidemias (Koeleman *et al.*, 2014), sendo que, este processo de adesão está ligado com a formação de biofilmes por *A. baumannii*, sendo este o passo inicial e principal para que tal ocorra nas mais diversas superfícies bióticas ou abióticas.

A capacidade que as células bacterianas têm de formarem biofilme, é atualmente considerada um dos fatores de virulência mais comuns, sendo frequentemente encontrado num grande número de isolados clínicos de *A. baumannii* que são capazes de formar tais estruturas. Para além disso, esta capacidade da bactéria *A. baumannii* é também um dos principais fatores que lhe confere resistência a antibióticos, bem como aumentar a sobrevivência bacteriana em superfícies abióticas e bióticas. *A. baumannii* pode ser encontrado tanto em superfícies hidrofílicas como hidrofóbicas (ex.: vidro e plástico, respetivamente), sendo com frequência isolada em instrumentos hospitalares. Os seus biofilmes estão diretamente relacionados com o aumento do risco de surtos de infeções nosocomiais devido à colonização de equipamento hospitalar e instrumentos cirúrgicos, tais como cateteres urinários, cateteres intravenosos, tubo endotraqueais, entre outros (Longo, Vuotto and Donelli, 2014). Os biofilmes, podem ainda promover o desenvolvimento de resistências

aos agentes antimicrobianos, bem como conferir proteção contra stress provocados pelas condições externas, tais como ambientes com reduzida quantidade de água e/ou disponibilidade de nutrientes (Duarte, Ferreira, *et al.*, 2016).

Numa abordagem genética e realizando a comparação da expressão de genes entre as células do biofilmes de *A. baumannii* que se encontram em divisão e as células planctónicas, verificou-se que há uma maior organização do metabolismo dos aminoácidos bem como dos ácidos gordos, transporte ativo e mobilidade bacteriana, metilação do ADN, regulação da transcrição e do processo de QS. Isto tudo ocorre devido a uma sobre expressão de 1621 genes, em que destes 55 apenas se encontram expressos em células sésseis de *A. baumannii* (Longo, Vuotto and Donelli, 2014).

Para que ocorra a adesão do biofilme a células epiteliais, foi demonstrado que o passo inicial é mediado pelo pílus, o que tem como consequência a colonização do hospedeiro, levando depois ao desenvolvimento da infeção. Em todos os microrganismos, os processos de adesão e formação de biofilme estão dependentes tanto de fatores celulares como de fatores ambientais, tais como no caso de *A. baumannii* a presença de genes de resistência a antibiótico, as condições do meio de crescimento e a própria densidade celular. A formação de biofilmes por esta bactéria é ainda potenciada pela presença e expressão do gene *bla_{PER-1}*, mas o seu mecanismo de ação ainda não se encontra totalmente compreendido, nem é um fator determinante, uma vez que foram encontrados isolados clínicos que mesmo possuindo e expressando o gene não formavam um biofilme (Bhargava, Sharma and Capalash, 2010). Quanto às condições ambientais, fatores como temperatura, presença ou ausência de luz, presença de etanol e concentração extracelular de iões de ferro livres são extremamente importantes, pois na ausência deste último há uma redução tanto na adesão como na formação do biofilme em superfícies abióticas e bióticas. (Longo, Vuotto and Donelli, 2014).

Segundo estudos realizados em variadas estirpes de *A. baumannii* de referência e de isolados clínicos, em algumas verificou-se que a produção do pílus é necessária para os passos iniciais de ligação da célula bacteriana a superfícies abióticas, o que resulta na formação de micro colónias que originarão posteriormente um biofilme (Longo, Vuotto and Donelli, 2014).

2.3.5.1. Quorum-sensing e formação de biofilmes

Entre bactérias, existe uma constante associação e comunicação, bem como com os hospedeiros eucariotas, pelo que são produzidas pelas bactérias moléculas que se ligam a proteínas reguladoras, ativando/regulando a expressão genética bacteriana. Denomina-se por *quorum-sensing* (QS) o processo de comunicação celular que coordena a expressão de múltiplos fatores de virulência quando uma certa densidade populacional é atingida, bem como processos de motilidade e ainda

formação de biofilmes. Este processo é comumente usado por patógenos bacterianos tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter baumannii*, entre outros. Segundo vários estudos realizados, é evidente que o QS aumenta em modelos animais e infecções humanas, a virulência de microrganismos patogênicos (Castillo-Juárez *et al.*, 2015).

Em bactérias Gram-negativas, as moléculas Acil Homoserinas Lactonas (AHL) mediam processos como produção de fatores de virulência, transferência de plasmídeos, bioluminescência e formação de biofilmes (Bhargava, Sharma and Capalash, 2010; Castillo-Juárez *et al.*, 2015; Cavaleiro *et al.*, 2015). Este sistema AHL é mediado por duas proteínas do tipo LuxI e LuxR, sendo que a primeira sintetiza AHLs que interagem diretamente com as proteínas, formando um complexo que se liga ao promotor lux-box que regula a expressão dos genes alvo do QS (Greenberg, 2001), sendo que o processo é influenciado por condições externas como disponibilidade de nutrientes.

Tanto as estirpes ambientais como os isolados clínicos do gênero *Acinetobacter* spp. são capazes de produzir moléculas sinal de QS, pelas quais as bactérias controlam a adesão e a formação de biofilmes em resposta à densidade populacional. Algumas estirpes possuem uma lactona, lactona N-3-hidroxidodecanoil-homoserina que facilita a formação de biofilmes, ao passo que outras possuem uma lactona sintase de homoserina, A1S_0109, que quando sobre expressa promove o crescimento de biofilmes a partir de células planctônicas de *Acinetobacter baumannii* (Longo, Vuotto and Donelli, 2014).

De uma forma geral, em bactérias patogênicas, a maioria dos genes que controlam o processo de QS, codificam diversos fatores de virulência, tais como proteases, toxinas e adesinas. (Castillo-Juárez *et al.*, 2015).

2.3.6. Sideróforos e Vesículas da Membrana Externa

Uma vez que o ferro na forma férrica é muito pouco disponível devido à sua reduzida solubilidade, a maioria das bactérias aeróbias produzem moléculas de baixo peso molecular, com elevada afinidade para este íon, denominadas de sideróforos. *Acinetobacter baumannii* possui sideróforos e acinetobactina, uma molécula considerada como fator de virulência cuja produção ocorre mais frequentemente em estirpes multirresistentes do que em isolados com reduzida virulência. A biossíntese de acinetobactina e o seu transporte pelo organismo do hospedeiro contribui para que as células de *A. baumannii* persistam mais tempo nas células epiteliais hospedeiras, o que causa danos e promove a morte do hospedeiro. (Saha *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2017a).

Finalmente, *A. baumannii* possui ainda vesículas na membrana externa (do inglês OMV - *Outer Membrane Vesicles*) que foram reportadas como importantes para a virulência de *A. baumannii*.

Estas interferem com as células do hospedeiro por transferência de fatores de virulência para o interior da célula, tais como OmpA, proteases e fosfolipases, provocando citotoxicidade no hospedeiro (Kwon *et al.*, 2009). Facilitam ainda a transferência horizontal de genes, o que pode estar associado com o aumento de resistências desta bactéria aos diversos antibióticos. Estas vesículas, estão ainda encarregues de proteger a célula bacteriana da resposta imunitária e, para além disso, as OMV conseguem entregar a proteína OmpA no interior das células eucarióticas e induzir a sua morte (McConnell, Actis and Pachón, 2013).

2.4. Resistências antimicrobianas e mecanismos de resistência

A capacidade que as bactérias têm de desenvolver resistências aos antibióticos consiste em quatro mecanismos principais (Fernandes, Amador and Prudêncio, 2013; Nowak and Paluchowska, 2016a; Lee *et al.*, 2017a):

- Ligação ou degradação enzimática dos antibióticos;
- Modificação do alvo do antibiótico o que provoca a perda parcial ou total de afinidade;
- Extrusão dos antibióticos do interior da célula;
- Alteração da concentração de antibiótico que consegue entrar na célula por alterações de permeabilidade membranar.

Estes mecanismos de resistência por parte de bactérias patogénicas em geral, onde se inclui *A. baumannii* estão ilustrados na Figura 2, especificamente para bactérias Gram-negativas.

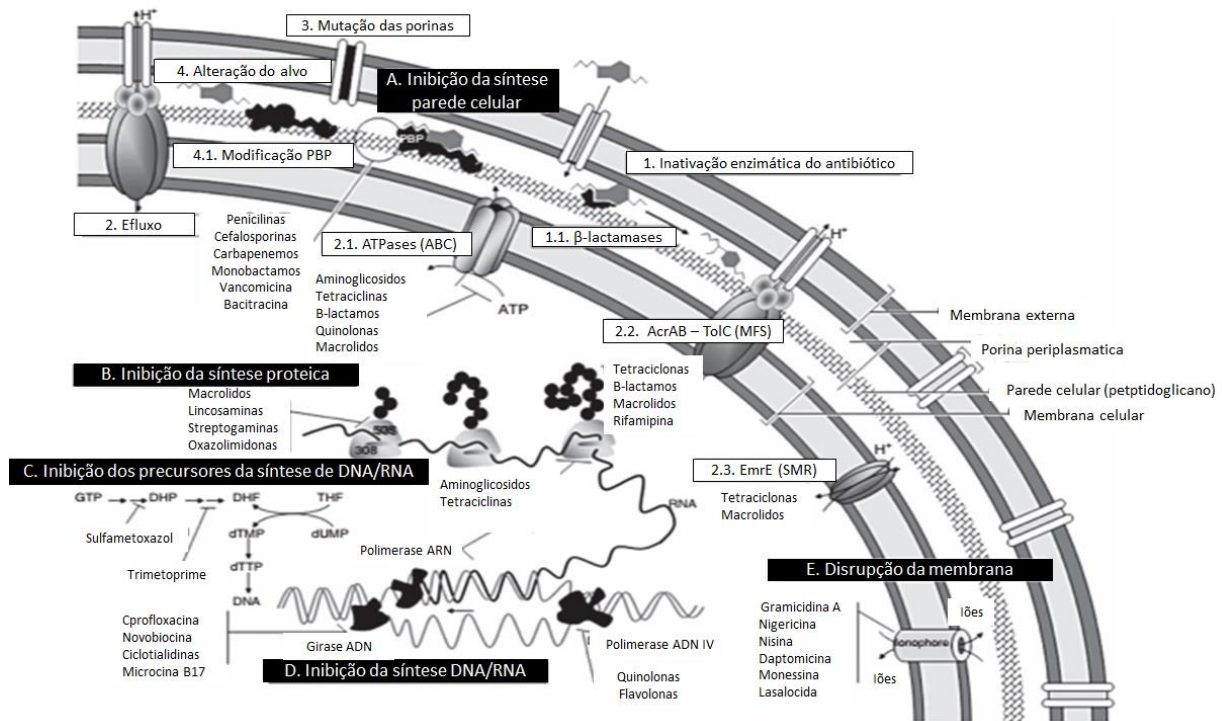


Figura 2: Diferentes mecanismos de resistência a antibióticos encontrados em bactérias Gram-negativas (Adaptado de Fernandes, Amador and Prudêncio, 2013).

2.4.1. Mecanismo geral dos antibióticos

Os antibióticos são agrupados consoante o seu modo de ação na célula bacteriana, podendo ser classificados como antibióticos antiparietais, antimembranares, inibidores da síntese proteica, inibidores da síntese de ácidos nucleicos e antimetabolitos. Antibióticos antiparietais atuam nas fases de síntese do peptidoglicano, afetando por isso a integridade da parede celular e levando à lise da célula bacteriana. A este grupo pertencem os antibióticos β-lactâmicos. Os antibióticos antimembranares afetam a permeabilidade da membrana celular, ao passo que os antibióticos como o cloranfenicol e tetraciclina são inibidores da síntese proteica uma vez que atuam nas diferentes subunidades dos ribossomas. Como antibióticos com atividade antimetabolitos, isto é, que inibem as cadeias metabólicas que permitem a manutenção da viabilidade celular, existe uma classe de antibióticos sulfonamidas. Por fim, como exemplo de antibióticos que inibem a ação das topoisomerasas existem as quinolonas (Filipa and Duarte, 2011; Fernandes, Amador and Prudêncio, 2013).

Os antibióticos β-lactâmicos são degradados enzimaticamente por hidrólise do anel β-lactâmico dando origem ao ácido penicilóico que é desprovido de atividade antimicrobiana, acontecendo

o mesmo para as cefalosporinas e os carbapenemos. Uma vez que os antibióticos β -lactâmicos são dos antibióticos de primeira linha a serem usados em terapias contra *Acinetobacter baumannii*, bem como dos antibióticos a que esta bactéria apresenta mecanismos específicos de resistência como produção de enzimas que degradam os antibióticos como as β -lactamases, torna-se importante compreender estes mecanismos.

2.4.1.1. B-Lactamases

As β -lactamases são enzimas bacterianas capazes de hidrolisar os antibióticos β -lactâmicos. São enzimas codificadas por genes presentes em plasmídeos ou no cromossoma que têm a capacidade de degradação do anel β -lactâmico na ligação CO-N, inibindo a sua atividade. Têm um papel fundamental em bactérias Gram-negativas, pois são o seu principal mecanismo de defesa após contacto por antibióticos β -lactâmicos. Quando a informação necessária para a sua codificação está contida em plasmídeos, é possível que este mecanismo de resistência seja transferido entre diferentes bactérias (Fernandes, Amador and Prudêncio, 2013; Azevedo, 2014).

A β -lactamase PER-1 é considerada um fator de virulência de *A. baumannii*, sendo uma β -lactamase de grande espectro e o gene que a codifica está, ao mesmo tempo, associado com a adesão celular, pois as estirpes encontradas com capacidade de produzir PER-1 aderem a algumas linhas celulares, ao passo que as incapazes de produzir esta proteína são, conseqüentemente, incapazes de aderir às células (Lee *et al.*, 2017a).

2.4.2. Alteração dos alvos de ação dos antibióticos

Uma vez que os antibióticos atuam a nível das funções vitais da célula bacteriana, a modificação dos locais alvo de ação dos antibióticos pelas bactérias tem como objetivo alterar a especificidade de ligação e, desta forma, reduzir o seu efeito na célula por impedimento de uma ligação correta e eficaz das moléculas de antibiótico. Deste modo, as bactérias com alterações mutacionais nestes alvos de ação, reduzem a possibilidade de o alvo ser inativado, mantendo ao mesmo tempo a sua função normal (Dzidic, Suskovic and Kos, 2008). Assim o segundo mecanismo mais importante de evasão aos antibióticos existente em *A. baumannii* é a modificação do local de ação dos antibióticos de forma a que a ação dos antibióticos seja mais reduzida ou mesmo ineficaz, o que promove a resistência desta bactéria (Dzidic, Suskovic and Kos, 2008; Lee *et al.*, 2017b). Por exemplo, a resistência à quinolona está associada a modificações na GyrA, uma das subunidades da ADN girase,

e modificações na ParC, uma das subunidades da topoisomerase IV. Por sua vez, pensa-se que a resistência à tetraciclina esteja associada com o gene *tetM*, mais em concreto com uma resistência através do desenvolvimento de uma proteção ribossomal (Lee *et al.*, 2017a).

2.4.3. Bombas de efluxo

Outra forma que *A. baumannii* desenvolveu de resistir ao efeito dos antibióticos, foi a sobre produção e expressão de bombas de efluxo, sendo que no reino procariota, estas são agrupadas consoante o seu substrato específico e variam estruturalmente entre si, o que possui uma implicação direta no tratamento de doentes devido à vasta gama de diferentes antibióticos que podem ser expelidos por estas bombas de efluxo (Wieczorek *et al.*, 2008; Nowak and Paluchowska, 2016a). As proteínas que constituem estes sistemas encontram-se divididas em cinco superfamílias distintas, organizadas com base na homologia da sequência de aminoácidos:

- *Major Facilitator Superfamily (MFS)*;
- *Multiple Antimicrobial and Toxic compounds Extrusion (MATE)*;
- *Small Multidrug Resistance (SMR)*;
- *ATP-binding cassette (ABC)*;
- *Resistance Nodulation cell Division (RND)*.

Destas, a última superfamília é a mais relevante no processo de resistência por parte de bactérias Gram-negativas como é o caso de *A. baumannii* (Peleg, Adams and Paterson, 2007; Gibbons, 2008; Wieczorek *et al.*, 2008; Srinivasan *et al.*, 2015). O sistema AdeABC da família RND está associado com a resistência a aminoglicosídeos e diminuição da suscetibilidade aos antibióticos imipenem e tigeciclina e outros antibióticos que não fluoroquinolonas. Este sistema parece ser indispensável nas estirpes selvagens de *A. baumannii* e é controlado pelo sistema AdeRS. Sabe-se ainda que fazem parte da família RND as bombas de efluxo AdeFGH e AdelJK que são sinergicamente associadas com a resistência à tigeciclina em *A. baumannii* (Peleg, Adams and Paterson, 2007; Lee *et al.*, 2017a).

Em *A. baumannii* podem também encontrar-se sistemas da superfamília MFS cujas bombas de efluxo estão relacionadas com a resistência ao cloranfenicol, CmlA e CraA, bem como a bomba de efluxo relacionada com a resistência à tetraciclina, TetA. Por sua vez, a bomba de efluxo AmvA media a resistência a diferentes classes de antimicrobianos como a eritromicina, desinfetantes, detergentes e corantes. Recentemente foi descoberta a bomba de efluxo AbaF que confere resistência à fosfomicina, a bomba de efluxo AbeM pertencente à família MATE que confere resistência bacteriana ao imipenem e fluoroquinolonas, ao passo que a bomba de efluxo AbeS pertencente à

família SMR, confere resistência a variados compostos antimicrobianos. A deleção do gene *abes* (gene que codifica a bomba de efluxo AbeS) resulta num aumento da suscetibilidade a vários compostos antimicrobianos tais como cloranfenicol, ácido nalidíxico e eritromicina. Em *A. baumannii*, e à semelhança do que acontece para a da bactéria *Escherichia coli*, existem as bombas de efluxo MacAB-TolC e EmrAB-TolC em que a primeira confere resistência à azitromicina e eritromicina, enquanto que a segunda confere resistência à netilmicina, tobramicina e ao imipenem (Lee *et al.*, 2017a).

2.4.4. Alteração da permeabilidade membranar

Da constituição das bactérias Gram-negativas faz parte a membrana externa que é constituída por uma camada interna de fosfolípidos e uma camada externa contendo LPS. Esta membrana externa diminui a internalização dos fármacos para o interior da célula bacteriana via porinas através da diminuição do tamanho do poro, do número ou hidrofobicidade das porinas, dificultando a difusão dos antibióticos. No entanto, os antibióticos podem entrar na célula bacteriana por difusão através das porinas, através da bicamada fosfolipídica ou através *self-promoted uptake*, sendo que o modo de entrada na célula depende da composição química da molécula do antibiótico. No caso específico dos antibióticos β -lactâmicos nas bactérias Gram-negativas, a sua internalização ocorre via porinas, pelo que, uma diminuição do tamanho poro, uma diminuição do número de porinas expressas ou da sua seletividade terá uma influência direta na diminuição da taxa de difusão do antibiótico, tendo como consequências alterações nas resistências bacterianas (Poirel and Nordmann, 2006; Dzidic, Suskovic and Kos, 2008).

Capítulo 3 - Estratégias de controlo de *Acinetobacter baumannii*

3.1. Terapias antibióticas

Devido ao uso frequente e descontrolado de antibióticos na sociedade moderna, hoje em dia as infeções causadas por *A. baumannii* são de difícil tratamento, tanto pelas suas resistências intrínsecas, bem como pela facilidade que as bactérias têm em adquirir e acumular novos mecanismos de resistência, como ainda pela facilidade de trocas de informação genética. Isto levou a que uma grande parte das estirpes de *Acinetobacter baumannii* sejam resistentes à maioria dos antibióticos disponíveis, tendo-se encontrado recentemente estirpes resistentes a todos os antibióticos conhecidos (Giamarellou, Antoniadou and Kanellakopoulou, 2008).

Como agente antimicrobiano pode definir-se todo e qualquer agente que promova a inibição do crescimento ou a morte de um microrganismo. Um antibiótico é um agente antimicrobiano de origem natural ou sintética, podendo no caso de ter origem sintética ser denominado como agente quimioterapêutico. Os antibióticos são considerados moléculas orgânicas de reduzido peso molecular, ou metabolitos secundários produzidos em resposta a alguns microrganismos que competiam pelas mesmas fontes de nutrientes (Fleming, 2001; Fernandes, Amador and Prudêncio, 2013).

De uma forma geral, os antibióticos possuem diversos modos de ação sendo, que estes se podem dividir em cinco categorias (Lee *et al.*, 2017a):

- Antibióticos que inibem a síntese da parede celular;
- Antibióticos que alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática;
- Antibióticos que inibem a síntese de ácidos nucleicos;
- Antibióticos que inibem a síntese proteica;
- Antibióticos com ação antagonista no metabolismo microbiano.

Devido a casos frequentes de infeções causadas por *A. baumannii* foi necessário descobrir terapêuticas para o tratamento destas infeções, tendo-se para isso usado terapias antibióticas como os β -lactâmicos.

Dos antibióticos β -lactâmicos disponíveis atualmente, todos possuem o anel reativo β -lactâmico e uma amina cíclica reativa, sendo este anel β -lactâmico que determina o mecanismo de ação bem como a toxicidade para o organismo, que uma vez que atua a nível da inibição da síntese do peptidoglicano, não apresenta perigo para as células eucarióticas, ou seja, etiotrópico. Por sua vez, este anel também está responsável por determinar o mecanismo de resistência bacteriano (Azevedo, 2014). Nos antibióticos β -lactâmicos existem cinco anéis reativos, incluindo o anel penemo, carbapenemo, cefemo e monobactâmico (Fernandes, Amador and Prudêncio, 2013).

Os antibióticos β -lactâmicos têm um papel concreto na biossíntese do peptidoglicano, comprometendo a estabilidade e viabilidade da célula bacteriana. Isto ocorre na fase parietal que ocorre no citoplasma da célula bacteriana, onde há a ligação de novos fragmentos de peptidoglicano à parede celular já existente, dando origem à formação de pontes interpeptídicas. Há ainda a possibilidade de que estes antibióticos tenham efeito nas autolisinas endógenas bacterianas, levando à degradação enzimática do peptidoglicano (Azevedo, 2014). Estes antibióticos são de grande importância no tratamento de infecções por *Acinetobacter baumannii*, uma vez que esta bactéria é Gram-negativa e a sua parede celular possui peptidoglicano ao contrário das células do hospedeiro.

Apesar dos antibióticos carbapenemos serem eficazes no tratamento de infecções por *A. baumannii*, tem-se verificado um aumento gradual, mas contínuo de isolados clínicos desta bactéria que são resistentes a este antibiótico, cuja consequência é que, cada vez mais, a escolha de antibióticos com uso efetivo no tratamento de infecções causadas por esta bactéria tem-se vindo a tornar mais reduzida. Desta forma, para combater *A. baumannii* resistente a múltiplos antibióticos ou mesmo a todos os antibióticos disponíveis, são necessárias novas alternativas (Lee *et al.*, 2017a).

A terapia combinatória é frequentemente usada no tratamento de infecções severas causadas por bactérias Gram-negativas, mas, no entanto, é um assunto controverso quando comparando os potenciais benefícios desta terapia com a monoterapia, uma vez que há uma necessidade de se assegurar a segurança do tratamento, os efeitos sinérgicos e a potencialidade do desenvolvimento de resistências aos antibióticos usados, uma vez que o seu uso excessivo está associado com um aumento de superinfecções, seleção de estirpes multirresistentes, risco de toxicidade e custos elevados (Towner, 2009; Tängdén *et al.*, 2014).

Observou-se que o uso conjunto de cefalosporinas com o aztreonam, estava associado à presença de isolados de *Acinetobacter* spp. multirresistentes, incluindo resistentes a carbapenemos, sendo que o mesmo não se verificou com o uso conjunto com outras classes de antibióticos (Giamarellou, Antoniadou and Kanellakopoulou, 2008). Os antibióticos frequentemente usados para tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, tais como o imipenem, meropenem e doripenem por serem considerados eficazes no tratamento destas infecções, têm vindo a cair em desuso uma vez que se tem verificado uma diminuição da suscetibilidade bacteriana. Deste modo foi necessário o

desenvolvimento de novas alternativas, tendo-se optado pela administração conjunta de carbapenemos com antibióticos eficazes contra *A. baumannii* tais como minociclina/tigeciclina e as polimixinas (colisistina e polimixina B). Contudo, atualmente, têm-se verificado um aumento de estirpes resistentes a esta terapia de recurso, o que se torna uma ameaça para a saúde pública a nível mundial (Lee *et al.*, 2017a).

Segundo um estudo realizado em Espanha, onde foram analisados os potenciais fatores de risco relacionados com a aquisição de resistências ao imipenem, concluiu-se que o tamanho do hospital, as diferentes terapêuticas de antibióticos administradas e o uso de cateteres durante e pós cirurgias, bem como a ineficácia de uma distinção correta entre colonização e infeção bacteriana eram os principais fatores. Verificou-se que dos 203 pacientes que fizeram parte deste estudo, foram isoladas estirpes de *A. baumannii* resistentes ao imipenem em 43% destes (Giamarellou, Antoniadou and Kanellakopoulou, 2008).

Sulbactam é uma molécula inibidora da enzima β -lactamase e das PBP, cujas alterações estruturais e mutações são dois dos principais mecanismos de resistência de *A. baumannii*. Tem-se investigado a terapia combinada de sulbactam com antibióticos como a penicilina e, segundo os resultados, parece ser eficaz no tratamento de infeções sistémicas causadas por *A. baumannii* multirresistente. Por sua vez, o uso combinado de ampicilina/sulbactam/carbapenemo é também eficaz contra bacteremias causadas também por *A. baumannii* multirresistente, infeções cutâneas e nos tecidos moles causadas por esta bactéria resistente a carbapenemos. No entanto esta terapia revelou-se ineficaz para o combate de pneumonias associadas ao uso de ventilação assistida do paciente (Anton Y. Peleg, Seifert and Paterson, 2008; Vila and Pachon, 2008). Outra molécula inibidora das β -lactamases é o tazobactam. Esta molécula, em *A. baumannii*, consegue aumentar a atividade de péptidos com propriedades antibióticas como a colistina e a daptomicina em modelos animais com pneumonia, devido à sua semelhança estrutural entre inibidores de β -lactamases e estes péptidos antibióticos (Lee *et al.*, 2017a). Por sua vez, para o tratamento de sépsis causadas por bactérias Gram-negativas como *A. baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, a terapia combinatória inclui tipicamente antibióticos β -lactâmicos de largo espectro e aminoglicosídeos ou fluoroquinolonas. Contudo o uso de combinações de colistina têm vindo a ser mais frequentemente usadas como tratamento de último recurso para estirpes multirresistentes de *A. baumannii*. Para o caso específico de *Acinetobacter spp.*, combinações de ampicilina/sulbatamo, carbapenemo, colistina ou rifampicina têm apresentado resultados positivos no tratamento de infeções causadas por este microrganismo (Tängdén *et al.*, 2014).

3.2. Terapias não antibióticas

Uma vez que *A. baumannii* é uma bactéria extremamente propensa ao desenvolvimento de resistências a antibióticos, tal como mencionado anteriormente, e um patógeno com disseminação global, o desenvolvimento de novas terapias alternativas ao uso de antibióticos atualmente utilizados, pode ser uma nova forma de combate a infecções causadas por esta.

Uma terapia alternativa que se tem estudado é o uso de bacteriófagos com o intuito de infectar a bactéria com o vírus de forma a provocar a sua lise. Para isso tem-se recorrido a vários bacteriófagos para *A. baumannii* como o vB_Ab-M-G7 e o Bφ-C62, bem como a uma endolisina codificada por bacteriófagos que consegue provocar a lise por degradação da parede celular da bactéria hospedeira. Por exemplo, a endolisina do bacteriófago ØABP-01 degrada a parede celular de *A. baumannii* e possui uma elevada atividade antibacteriana quando administrada conjuntamente com a colistina. No entanto, esta alternativa tem o inconveniente de que a maioria das bactérias Gram-negativas patogénicas não são suscetíveis às endolisinas devido à membrana externa protetora. Deste modo, como alternativa, têm-se manipulado estas endolisinas com péptidos desestabilizadores da membrana, às quais se deram o nome de “artilisinas” (Lee *et al.*, 2017a). Também se tem estudado o uso de fagos para inibir o processo de formação de biofilmes, bem como promover a sua disrupção, uma vez que já se verificou que este fago promove a lise de 49% dos isolados clínicos de *A. baumannii* (López-Rojas, Smani and Pachón, 2013).

Para além do uso de bacteriófagos, também se tem apostado no desenvolvimento de vacinas que ativem o sistema imunitário inato para combater infecções causadas por *A. baumannii*. No entanto ainda não se conseguiu desenvolver vacinas ou anticorpos para o tratamento de infecções causadas por esta bactéria. Uma vez que infecções causadas por *A. baumannii* estão geralmente associadas a situações de pós-operatório, internamento em UCI em que seja necessário ventilar o doente, o desenvolvimento de vacinas para estes casos seria uma boa alternativa (McConnell and Pachón, 2010). Mas este processo complicado devido ao facto de não se terem identificados antígenos na célula bacteriana e serem vários os fatores de virulência para este microrganismo. Desta forma, células bacterianas inativadas ou atenuadas têm sido usadas para o desenvolvimento de algumas vacinas com o objetivo de estimular respostas fortes por parte do sistema imunitário inato. Este tipo de vacinas que usam o microrganismo completo podem ser uma vantagem, uma vez que fornecem uma maior proteção ao organismo, pois existe uma maior gama de antígenos capazes de induzir respostas imunitárias, fornecendo proteção contra um maior número de estirpes e espécies bacterianas (López-Rojas, Smani and Pachón, 2013; Pletz *et al.*, 2016).

Em *Acinetobacter* e outras bactérias Gram-negativas, os complexos proteicos de bombas de efluxo do tipo AcrAB-TolC, conferem resistência aos antibióticos de variadas classes, e são considerados

os sistemas predominantemente responsáveis por resistências inatas e adquiridas a múltiplos antibióticos. Assim sendo, tem-se vindo a desenvolver formas de melhorar a eficiência ou potência dos antibióticos, por bloqueio destes sistemas, com inibidores de bombas de efluxo (EPI do inglês *Efflux Pump Inhibitors*), o que para além do efeito benéfico e pretendido de inibição da maquinaria bacteriana de efluxo, tem também outras vantagens a nível da patogenicidade, virulência e formação de biofilmes (Ohene-Agyei *et al.*, 2014). Para além disso, o uso de EPIs conjuntamente com terapias recorrentes consegue reduzir a invasão das células bacterianas nas células hospedeiras. Estas moléculas podem atuar por interação com o sistema regulatório bacteriano das bombas de efluxo, disrupção de componentes da bomba de efluxo, inibição da extrusão do composto ativo usado por competição aumentando a sua biodisponibilidade, bloqueio dos poros responsáveis pelo efluxo e, por fim, por interação com a cadeia energética necessária para o bom funcionamento das bombas de efluxo bacterianas (Askoura *et al.*, 2011). Uma grande variedade de compostos têm sido testados com o intuito de servirem como EPIs tais como análogos de antibióticos em *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., compostos como fenilalanina arginina β -naftilamina (PABN) e carbonil cianide 3-clorofenilhidrazona (CCCP), sendo que a sua aplicação em humanos está ainda limitada devido à sua elevada toxicidade quando comparada com os benefícios clínicos apresentados (Gibbons, 2008; Askoura *et al.*, 2011).

Os péptidos antimicrobianos são componentes do sistema imunitário inato e apresentaram resultados promissores nos ensaios experimentais até agora realizados. Um grande número destes péptidos tem sido testado contra um largo espectro de bactérias, incluído o *Acinetobacter* spp. Alguns dos péptidos testados apresentaram resultados positivos mesmo quando contra estirpes de *A. baumannii* resistentes a colistina, tratamentos com sucesso contra bacterémias murínicas e ainda alguma eficiência no tratamento de sépsis causada por estirpes de *A. baumannii* resistentes a todos os antibióticos conhecidos (Vila and Pachón, 2008).

Mais importante que matar a bactéria *A. baumannii* no organismo hospedeiro, é impedir que esta produza os seus fatores de virulência e, desta forma, cause dano no organismo. Também se tem apostado no estudo de inibidores de β -lactamases para além dos já conhecidos ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam, e de agentes que encontram e se ligam aos genes responsáveis pela expressão e/ou regulação destes fatores de virulência ou aos genes responsáveis pela resistência bacteriana. Esta última abordagem genética aparenta ter algum futuro, uma vez que estes agentes seriam específicos para a bactéria devido à falta de homologia com o genoma do hospedeiro. Também se tem apostado no estudo e desenvolvimento de inibidores da síntese proteica bacteriana, mais em concreto recorrendo ao uso de nucleases intracelulares (Woodford *et al.*, 2009).

Outras alternativas que têm sido descritas consistem na aplicação de emplastos de alho, ou de óxido nítrico gasoso como forma de prevenção de formação de biofilmes em feridas (López-Rojas, Smani and Pachón, 2013).

3.3. Barbituratos e derivados do ácido barbitúrico

O ácido barbitúrico (Figura 3) é um composto orgânico heterocíclico, baseado no esqueleto heterocíclico da pirimidina e é considerado farmacologicamente inativo. Por sua vez, após sofrerem alterações e serem adicionados grupos substituintes, os seus derivados apresentam propriedades hipnóticas, sedativas, anestésicas, anti convulsionantes, antidiabéticas, anti-inflamatórias, bem como propriedades antimicrobianas (Kumar *et al.*, 2013; Sokmen *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014). No entanto grandes dosagens de barbitúricos afeta diretamente o sistema cardiovascular, induz o coma, vasodilatação periférica, aumento dos níveis de açúcar no sangue e baixa pressão sanguínea (Khan *et al.*, 2014).

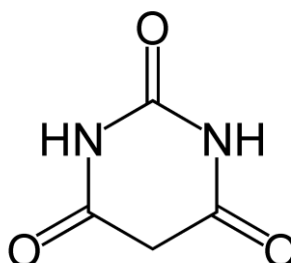


Figura 3: Estrutura da molécula de ácido barbitúrico.

Nos últimos anos, derivados de barbituratos e tiobarbituratos têm sido estudados devido aos seus diversos efeitos biológicos, tais como: inibidores da colagenase-3, das metaloproteinases da matriz; recombinação com enzimas do citocromo P450, metionina aminopeptidase-1, tirosinase e urease; para além de atividade antioxidante (Yan *et al.*, 2009; Sokmen *et al.*, 2013).

Ainda que geralmente o ácido barbitúrico e o tiobarbiturato não apresentem propriedades antibacterianas, muitos dos seus derivados apresentaram bons resultados para uma larga gama de bactérias testadas, tais como *Staphylococcus spp.*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Yan *et al.*, 2009), daí o interesse no estudo deste tipo de compostos em outros microrganismos.

De uma forma geral, estes derivados sintéticos de barbituratos e tiobarbituratos têm uma ação mais eficaz em bactérias Gram-positivas como o caso de *Staphylococcus aureus*, havendo efeito reduzido em bactérias Gram-negativas (Yan *et al.*, 2009; Sokmen *et al.*, 2013), sendo que contudo há casos que apresentam resultados promissores de atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas, mesmo em casos de estirpes bacterianas resistentes e com bombas de efluxo sobre expressas (Jeong and Moloney, 2015).

É ainda de interesse mencionar que muitos os compostos derivados do ácido barbitúrico, de uma forma geral, possuem propriedades físico químicas semelhantes aos antibióticos clínicos atualmente em uso, tanto para administrações para uso oral ou intravenosas, bem como peso molecular inferior a 400 Da e características como ligações flexíveis e um número de prótons doadores que tornam estas moléculas aptas para uma administração via oral (Jeong and Moloney, 2015).

Para a bactéria *A. baumannii* em específico ainda não se têm realizado estudos de aplicação de derivados de barbituratos e tiobarbituratos como agentes antibacterianos, e devido ao aumento de resistências desta bactéria a todos os antibióticos conhecidos bem como à maioria das terapias combinatórias, uma alternativa terapêutica é imperativa.

Capítulo 4 - Objetivos

Devido à existência de multirresistências de *Acinetobacter baumannii* a agentes antibacterianos, bem como à falta de alternativas terapêuticas, é necessário o estudo de novas moléculas para o controlo deste microrganismo. Deste modo, definiram-se como objetivos principais do trabalho:

1. Estudar a atividade antibacteriana de compostos derivados de 5-hidraziniletilidenepirimidinas desenvolvidas a partir do ácido barbitúrico em *A. baumannii*;
2. Estudar o mecanismo de ação dos compostos sintéticos derivados de barbituratos - ligação ao ADN bacteriano e/ou inibição das bombas de efluxo;
3. Estudar o efeito dos compostos sintéticos derivados de barbituratos na inibição de formação de biofilmes, QS e motilidade;
4. Avaliar a capacidade de hemólise dos compostos sintéticos derivados de barbituratos.

Capítulo 5 - Materiais e Métodos

5.1. Microrganismos

O microrganismo usado na realização dos ensaios foi a bactéria Gram-negativa, *Acinetobacter baumannii*. Foram selecionadas, para uso nos ensaios posteriormente mencionados, duas estirpes de referência (*A. baumannii* LMG1025 e *A. baumannii* LMG1041) e cinco isolados clínicos com distintos perfis de resistência a diversos antibióticos (AcB 13/10, AcB 36/10, AcB 43/10, AcB 44/10 e AcB 73/10), isolados de amostras de expetoração de doentes nas unidades hospitalares do Fundão e da Covilhã. Como termos de comparação dos resultados foram ainda usadas duas bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e duas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Bacillus cereus* ATCC 11778. Utilizou-se ainda a estirpe *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 para realização de uma monitorização de atividade anti *quorum-sensing*.

5.1.1. Condições de armazenamento e crescimento das estirpes

Para armazenamento a longo prazo todas as estirpes de *A. baumannii* foram conservadas em criopreservação a -80 °C. Assim, para a criação dos bancos de estirpes seguiram-se dois protocolos distintos consoante o perfil de resistência das estirpes que se pretendiam conservar. Para as estirpes de *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, ressuspendeu-se uma colónia a partir de uma cultura fresca em meio *Luria- Bertani* (LB) e incubou-se em 20 mL de meio LB a 37 °C, 250 rpm até se atingir uma densidade ótica a 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$) de 0,6, sendo que após isto se adicionou glicerol a uma concentração final de 20% (v/v), transferindo-se para tubos de criopreservação esta suspensão celular. Para as estirpes AcB 13/10, AcB 36/10, AcB 43/10, AcB 44/10 e AcB 73/10, removeu-se biomassa a partir de uma placa de LB agar com uma incubação de aproximadamente 24 horas a 37 °C e transferiu-se para um tubo de criopreservação estéril contendo 200 µL de meio BHI (*Brain Heart Infusion*), suplementado com 20% de glicerol (v/v).

Para armazenamento a curto prazo, as estirpes foram conservadas em refrigeração a 4 °C em placas de LB agar, por um período máximo de duas semanas, ou três passagens a partir dos bancos de estirpes.

5.2. Codificação e Estrutura dos Compostos

Para a realização deste trabalho foram usados vários antibióticos e compostos 5-hidraziniletildenopirimidinas desenvolvidos a partir de ácido barbitúrico (Tabela 2).

Os antibióticos usados neste trabalho (Tabela 1) foram tetraciclina (TET), eritromicina (ERY), cloranfenicol (CHL), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (sal de sódio) (GEN) e polimixina B (POLY B). Foram preparadas soluções padrão dos agentes antimicrobianos com uma concentração de 10 mg/mL dos antibióticos, solubilizados nos solventes recomendados pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) na norma M100-S15 (NCCLS, 2005). Assim, a tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina foram solubilizados em etanol a 95%, a gentamicina e polimixina B em água ultrapura estéril e a ciprofloxacina em água basificada. Foram realizadas alíquotas dos antibióticos armazenadas a -20 °C até utilização.

Tabela 1: Resumo dos agentes antimicrobianos.

Nome	Grau de Pureza (%)	Solvente
Tetraciclina	98	Etanol 95%
Eritromicina	96	Etanol 95%
Cloranfenicol	98	Etanol 95%
Ciprofloxacina	98	Água basificada
Gentamicina	98	Água ultrapura
Polimixina B	99,8	Água ultrapura

Relativamente aos compostos de síntese em estudo, foram preparadas soluções padrão dos seis compostos com concentrações de 25,6 mg/mL e 12,8 mg/mL, por solubilização de cada um dos diferentes compostos em dimetilsulfóxido (DMSO). Os compostos cristalizados foram armazenados a temperatura ambiente e protegidos da luz, enquanto as soluções stock foram armazenadas a 4 °C também protegidas da luz.

Tabela 2: Denominação, estrutura química e respectiva codificação aplicada neste trabalho dos compostos utilizados.

Nomenclatura e Estrutura dos Compostos			
Denominação	Codificação usada	Estrutura	Massa Molar (g/mol)
1,3-Dimetil-5-(1-(2-(4-nitrofenil)hidrazinil)etilideno)pirimidina-2,4,6-triona	JF20		333,3
5-(1-(2-(4-nitrofenil)hidrazinil)etilideno)pirimidina-2,4,6-triona	JF22		305,25
1,3-difenil-5-(1-(2-(4-nitrofenil)hidrazinil)etilideno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6-diona	JF23		473,51
1,3-Dimetil-5-(1-(2-fenilhidrazinil)etilideno)pirimidina-2,4,6-triona	JF24		288,31
5-(1-(2-fenilhidrazinil)etilideno)pirimidina-2,4,6-triona	JF25		260,25
1,3-Difenil-5-(1-(2-fenilhidrazinil)etilideno)-2-tioxodihidropirimidina-4,6-diona	JF26		444,57

5.3. Equipamento

Tabela 3: Lista dos equipamentos utilizados para os ensaios.

Tabela resumo de equipamento	
Designação	Marca/Modelo
Autoclave	Uniclave/88
Balança analítica	KERN
Câmara de fluxo laminar	Bioir
Centrífuga refrigerada para eppendorfs	Hettich / Mikro 200R
Centrífuga refrigerada	Beckam Coulter/ Allegra X-22R
Densitómetro	Biomérieux
Espectrofotómetro	Ultrospec U/V 3000
Estufa (37°C)	Binder
Estufa (30°C)	Nuaire
Fluorímetro	SpectraMAX GEMINI EM
Incubador orbital	Aralab
Leitor de microplacas	Alfagene / Anthos 2020
Nanoespectrofotómetro	IMPLEN NanoPhotometer
Transiluminador	UVITE

5.4. Reagentes

Tabela 4: Lista de reagentes utilizados nos ensaios.

Tabela resumo de reagentes		
Reagente	Grau de Pureza (%)	Fornecedor
Agar	-	Biokar
D-Glucose	99,5	Fisher Scientific
Cloreto de sódio	99,5	Fisher Scientific
LB agar	-	Conda
LB broth	-	Liofilchem
TSB	-	Merk
Extrato de levedura	-	Merk
Triptona	-	Conda
Dimetilsulfóxido (DMSO)	99,5	Fisher Scientific
Glicerol	99,5	Absolve
CCCP	99	Agros Organics
PABN	100	Sigma-Aldrich
Metanol	100	Chem-Lab
Etanol puro	99,9	Manuel Vieira & C ^a
Violeta de Cristal	93,5	Amresco
Brometo de Etídeo	Solução 1%	Fisher

5.5. Ensaio de atividade antibacteriana

5.5.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

De forma a determinar a suscetibilidade das bactérias em estudo aos antibióticos convencionais bem como aos compostos de síntese utilizados, recorreu-se ao teste de microdiluição em meio líquido para bactérias segundo o recomendado na norma M7-A6 do CLSI, para determinação de CMI, com algumas modificações (NCCLS, 2005). Assim, foram realizadas diluições sucessivas em placas de 96 poços dos compostos em meio LB para as bactérias Gram-negativas e meio *Trypic Soy Broth* (TSB) para as bactérias Gram-positivas, sendo que os compostos a concentração final máxima de DMSO usada foi de 2% (v/v). Na placa de 96 poços, procedeu-se então à realização das diluições sucessivas de 1:2 num volume de 50 µL em cada poço, de forma a obter os intervalos de concentração final de 32 - 0,5 µg/mL ou 256 - 4 µg/mL, conforme adequado, e adicionou-se o inóculo ajustado. Assim, as bactérias foram previamente repicadas de meio LB agar e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após este período de incubação, ressuspenderam-se colónias isoladas em solução salina (NaCl, 0,85% (m/v)), acertou-se a densidade ótica a 0,5 Unidades *McFarland* e preparou-se uma diluição de 1:100 em meio LB. Seguidamente foram adicionados 50 µL desta suspensão bacteriana a cada poço, obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 unidades formadoras de colónias por mililitro (ufc/mL). Em todos os ensaios foram realizados três tipos de controlos: controlo positivo de crescimento (50 µL meio LB + 50 µL de suspensão bacteriana), controlo negativo (100 µL meio LB), e controlo de esterilidade do composto (diluições sucessivas de composto sem inóculo, o que também permitiu avaliar a sua estabilidade relativamente à solubilidade ao longo do tempo de ensaio). As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas, sendo o crescimento avaliado visualmente por presença ou ausência de turbidez nos poços. A CMI foi definida como sendo a menor concentração de composto em que se verifica ausência de crescimento bacteriano a olho nú. Os ensaios foram efetuados em duplicado, realizando-se pelo menos três ensaios independentes.

Após a determinação de CMI, foi realizada a determinação da concentração mínima bactericida (CMB). Para tal, dos poços sem crescimento e após homogeneização do seu conteúdo, foram transferidos 20 µL para uma placa de LB agar. As placas foram incubadas a 37 °C durante 16-20 horas. Seguidamente contou-se o número de colónias formadas e determinou-se as ufc/mL. A CMB foi definida como a concentração de composto que provocou uma redução de 99,9% no número de unidades formadoras de colónias do inóculo inicial.

5.5.2. Ensaio de curvas de morte de células planctónicas com os compostos em teste

Para este ensaio seguiu-se o protocolo sugerido por Duarte et al. 2013 com ligeiras modificações, em que se pretende verificar se os compostos em teste têm influência nas curvas de crescimento das diversas estirpes de *A. baumannii* usadas. Para isso, cada uma das estirpes foi repicada para uma placa de meio LB agar, e incubadas durante 24 horas a 37 °C, tendo-se posteriormente ressuscitado uma colónia isolada em 20 mL de meio LB, e incubado durante 16 horas, a 37 °C, a 250 rpm. Inicialmente, a partir desta pré-cultura estabeleceu-se uma relação entre a $DO_{600\text{ nm}}$ e as ufc/mL. Assim, foi medida a $DO_{600\text{ nm}}$ da cultura e acertada a 0,5; 0,1; 0,01 e 0,001 com meio LB. Seguidamente, de forma a determinar as ufc/mL, procedeu-se a diluições sucessivas em placas de 96 poços em solução salina estéril, tendo-se transferido 10µL de cada diluição para placas de LB agar, incubado 24 horas e procedido à contagem das colónias formadas. Após este passo, selecionou-se a $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,001 para a estirpe de referência *A. baumannii* LMG 1025 e de 0,01 para as estirpes clínicas AcB 13/10 e AcB 73/10, para preparação do inóculo, correspondendo a cerca de 1×10^7 ufc/mL. Seguidamente, em tubos de centrífuga de 2 mL prepararam-se as diluições dos compostos com meio LB a concentrações finais de 1 x, 2 x e 4 x CMI e adicionaram-se 100 µL de suspensão celular com a $DO_{600\text{ nm}}$ ajustada, perfazendo um volume final de 1 mL. Neste ensaio foram sempre realizados dois controlos, um controlo de crescimento (sem composto) e um controlo de toxicidade de solvente (onde o composto foi substituído pela concentração máxima de solvente usada - 2% de DMSO (v/v)), sendo os tubos depois colocados a 37 °C sem agitação. O crescimento bacteriano foi depois avaliado por recolha de amostras de 20 µL aos tempos de incubação de 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas, tendo sido depois usadas para determinar as ufc/mL. Para isso, com a exceção da medição das 24 horas, numa microplaca de 96 poços foram realizadas diluições sucessivas decimais com solução salina. Para a realização da diluição das 24 horas optou-se por um método diferente, em que se procedeu à realização de diluições sucessivas em tubos de centrífuga de 1,5 mL. No fim foram retirados 10 µL de cada poço para placas de LB agar, as quais foram colocadas a incubar a 37 °C durante 24 horas, procedendo-se posteriormente à contagem das colónias.

5.5.3. Clivagem do plasmídeo pUC 18-K2 pelos compostos em teste

A clivagem do plasmídeo de *E. coli* pUC 18-K2 pelos compostos JF20, JF22 e JF24 foi determinada recorrendo a uma eletroforese de gel de agarose, tal como proposto por Raza et al. 2016. Para isso, iniciou-se o protocolo realizando uma pré-fermentação de *E. coli* contendo o plasmídeo (pADN)

pUC 18-K2 até se obter uma $DO_{600\text{ nm}}$ de 2,6 (entre 6 a 8 horas), de onde se retira o volume necessário para se iniciar a fermentação com uma $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,2, incubando-se durante 16 horas a 37 °C e 250 rpm. Passado este tempo a cultura foi centrifugada para obtenção do depósito celular. Seguidamente usou-se o kit NZY Miniprep para purificar o plasmídeo pUC 18-K2. Este kit permite realizar a lise celular, clarificação do lisado, e recolha do plasmídeo. O plasmídeo obtido foi quantificado por utilização de um nanoespetrofotómetro. De seguida, o plasmídeo pUC 18-K2 na concentração de 50 ng/ μL , foi adicionado aos compostos em estudo (gama de concentração 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$), num volume final de 20 μL . Incubaram-se as reações durante 4 horas a 37°C. Como controlos foram usadas reações de plasmídeo em que o composto foi substituído por tampão Tris-HCl ou pelo solvente à concentração mais elevada usada, ou seja, 4% (v/v) de DMSO. No final do tempo de incubação adicionaram-se 4 μL de loading buffer TAKARA (36% glicerol, 30 mM EDTA, 0,05% azul bromofenol e 0,05% xileno cianol) e as amostras foram carregadas num gel de 0,8% de agarose contendo 1,25 μL de *Midori Green*/40 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1×. O gel correu a 55 V durante 1 hora em tampão TAE e, no fim, as amostras foram visualizadas com luz ultravioleta (UV) de forma a ser possível verificar o aparecimento de bandas no gel resultantes da degradação do plasmídeo.

5.5.4. Ensaio de acumulação de brometo de etídeo

De forma a verificar se os compostos selecionados possuem alguma influência na inibição das bombas de efluxo de *A. baumannii*, realizou-se o ensaio de acumulação de brometo de etídeo, tal como sugerido por Pourhajibagher *et al.*, 2016. Assim, iniciou-se o protocolo com uma pré-cultura de uma colónia de *A. baumannii* em 20 mL de meio líquido LB durante 16 horas, a 37 °C a 250 rpm, transferindo-se depois 200 μL para uma nova cultura em 20 mL de meio LB e incubou-se nas mesmas condições até se atingir o meio da fase exponencial de crescimento (4 horas, e uma $DO_{600\text{ nm}}$ de aproximadamente 1,3). Seguidamente acertou-se a $DO_{600\text{ nm}}$ da suspensão celular em tubos de centrífuga de 2 mL, de forma a obter uma concentração celular final de 1×10^6 ufc/mL. Procedendo-se então a uma centrifugação, lavagem e ressuspensão das células com tampão fosfato salino (PBS - do inglês *Phosphate Buffer Saline*). A suspensão celular devidamente ajustada foi então incubada a 37 °C durante 10 minutos. Às células na placa, foram adicionados os compostos em estudo nas concentrações 0,5 x e 1 x CMI, tendo ainda sido usado o inibidor de bombas de efluxo (EPI - do inglês *Efflux Pump Inhibitor*), fenil-arginina- β -naftilanida (PABN - do inglês *Phenyl-Arginine-Beta-Naphthylamide*) na concentração de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como controlo positivo. De seguida, foi adicionado brometo de etídeo (EtBr - do inglês, *Ethidium Bromide*), a uma concentração final em cada poço de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A fluorescência foi medida a cada minuto, durante 1 hora a um comprimento de onda de excitação/emissão de 530/600 nm no fluorímetro. Para este ensaio utilizaram-se placas de 96

poços escuros de fundo transparente e os ensaios foram realizados em duplicado e em três ensaios independentes.

5.5.5. Modulação da resistência dos antibióticos

Este ensaio tem como objetivo verificar se há uma modulação da resistência aos antibióticos aquando do uso conjunto destes com os compostos em estudo, tal como descrito por Voukeng et al. (2016). Para isso, procedeu-se à determinação de CMI dos antibióticos na presença de concentrações subinibitórias dos compostos ($\frac{1}{2}$ x e $\frac{1}{4}$ x CMI), avaliando sempre em paralelo a CMI do antibiótico na ausência dos compostos. Seguidamente, incubou-se a placa de 96 poços a 37 °C durante 24 horas, após o qual se verificou a presença ou ausência de crescimento por visualização da turbidez e comparação com os controlos de CMI dos antibióticos. O ensaio foi realizado em duplicado e em três ensaios independentes. Foi considerado como havendo uma modulação na resistência aos antibióticos em teste quando ocorreu uma redução no valor de CMI.

5.5.6. Avaliação da inibição do mecanismo de *Quorum-sensing*

A avaliação da inibição do mecanismo de *quorum-sensing* pelos compostos foi realizada através de um ensaio qualitativo por difusão em disco, de acordo com o descrito por Duarte, Luís, *et al.*, (2016). Para tal, foi utilizada a estirpe *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. Esta bactéria Gram-negativa, tem a capacidade de sintetizar um pigmento de cor roxa denominado violaceína em resposta ao QS regulado pelas moléculas indutoras N-acilhomoserina lactonas, sendo por isso um dos ensaios de monitorização inicial de atividade anti-QS de compostos.

Para este ensaio começou-se por retirar uma alíquota de células do banco de criopreservação, inoculou-se numa placa de LB agar e incubou-se a placa a 30 °C durante 24 horas. Ao fim deste tempo, fez-se uma nova repicagem para uma placa de LB agar e incubou-se nas mesmas condições. Seguidamente, retirou-se uma colónia que foi suspensa em 20 mL de meio LB e incubada a 30 °C, a 250 rpm por 15 horas, tendo-se no fim deste tempo medido a $DO_{600\text{ nm}}$, a qual foi ajustada com meio LB a uma $DO_{600\text{ nm}}$ de 1. Esta suspensão foi usada para inoculação da superfície de uma placa de LB agar, esfregando a zaragatoa embebida na suspensão ajustada em três direções diferentes, permitindo assim uma distribuição uniforme do inóculo. A preparação dos discos, consistiu na realização de dois controlos, um controlo positivo de inibição de QS (resveratrol a 32 µg/disco) e um controlo negativo contendo 10 µL de DMSO no disco, bem como na preparação de um disco para

cada uma das soluções dos compostos a uma concentração final de 32 µg/disco. Após a secagem da placa e dos discos, com o auxílio de uma pinça esterilizada, os discos foram transferidos para a superfície da placa inoculada, tendo sido posteriormente incubadas durante 24 horas a 30 °C. Após incubação foi efetuada medição do halo de inibição de produção de pigmento violaceína (d_1), bem como do halo de inibição de crescimento de *C. violaceum* (d_2). Deste modo a Inibição do *quorum-sensing* (IQS) foi determinada pela subtração das médias do diâmetro da inibição de crescimento à média do diâmetro total ($IQS = d_1 - d_2$). O ensaio foi realizado em triplicado.

5.5.7. Avaliação do *swimming* bacteriano na presença dos compostos em teste

A motilidade bacteriana em meio semissólido foi determinada seguindo o protocolo proposto por Vijayakumar *et al.*, (2016), em que o foi avaliado o *swimming* em placas contendo 0,3% de agar bacteriano suplementadas com concentrações subinibitórias dos compostos ($\frac{1}{2}$ x e $\frac{1}{4}$ x CMI), sendo estas usadas no mesmo dia da sua preparação. Para isso, a partir de uma cultura fresca de cada estirpe, picou-se uma colônia isolada para o centro da placa de 0,3% de agar, em profundidade. Isolaram-se as placas com *parafilme* de forma a evitar a sua desidratação e incubaram-se novamente a 37 °C durante 24 horas. Após a incubação, foram medidos os halos de crescimento bacteriano, e os resultados comparados com o controlo. O ensaio foi realizado em triplicado.

5.5.8. Avaliação do efeito dos compostos em teste na inibição da formação de biofilmes

O objetivo desta metodologia foi verificar se, aquando da presença dos compostos no meio de cultura, existiria uma diminuição na formação de biofilmes por estirpes de *Acinetobacter baumannii*. Para isso, e seguindo a metodologia de Duarte *et al.* (2013), o efeito das diferentes concentrações dos compostos de síntese foi testado em placas de 96 poços. Deste modo, a partir de culturas em placas de agar com 24 horas de crescimento, ressuspendeu-se uma colônia em 20 mL de meio líquido LB, e incubou-se a 37 °C, a 250 rpm, durante 17 horas. Seguidamente acertou-se a $DO_{600\text{ nm}}$ a 0,02 e transferiram-se 50 µL da suspensão celular para cada poço, tendo sido previamente preparadas as diluições sucessivas dos compostos (4 x; 2 x; 1 x; 0,5 x e 0,25 x CMI), um controlo de solvente (2% de DMSO (v/v)), um controlo de formação de biofilme para cada estirpe e um controlo negativo. Posteriormente as placas foram incubadas durante 24 horas, a 37 °C em

condições estáticas, tendo-se ao fim deste tempo removido o meio cuidadosamente e procedido à coloração e lavagem dos biofilmes. Este passo consiste que, ao fim das 24 horas de incubação, o meio seja removido e os poços lavados com NaCl a 0,85%. Seguidamente o biofilme foi fixado com 200 µL de metanol, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Procedeu-se à remoção do metanol e deixou-se que evaporasse o restante que se encontrava no fundo dos poços. Adicionaram-se 200 µL de violeta de cristal a 0,1% durante 30 minutos, de forma a que os biofilmes fossem corados. Após este tempo removeu-se o corante e os poços foram lavados por três vezes com uma solução de NaCl 0,85%, para que todo o corante em excesso fosse removido, e com uma zaragatoa assegurou-se que não havia vestígios de corante nas paredes dos poços onde não se encontrava biofilme. Seguidamente, foram adicionados 200 µL de etanol a 95% durante 1 hora para remover o corante do biofilme e, após transferência de 125 µL do sobrenadante para uma nova placa, foi medida a absorvância num leitor de placas a 570 nm. Os ensaios foram realizados em sextuplicado, e pelo menos em três ensaios independentes. A percentagem de inibição de formação de biofilmes calculada conforme a seguinte fórmula sugerida por Jadhav et al. 2013:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \frac{\text{Média da Abs 570 nm dos Ensaios com Compostos}}{\text{Média da Abs 570 nm do Controlo DMSO}} \times 100$$

5.5.9. Avaliação da atividade hemolítica dos compostos em teste

De forma a avaliar o efeito dos compostos sobre eritrócitos humanos, procedeu-se à realização de um ensaio de hemólise. Após a recolha de sangue para um tubo de colheita cujo o anticoagulante seja EDTA, os eritrócitos foram recolhidos por centrifugação a 2000 rpm e 20 °C, durante 10 minutos. Posteriormente procedeu-se à lavagem com PBS dos eritrócitos por 3 vezes. Após a última lavagem, ao depósito celular obtido foi adicionado PBS de forma a que se obtivesse uma suspensão de 10% (v/v) de eritrócitos/PBS, sendo esta posteriormente diluída de 1:10 em PBS, para uma concentração final de eritrócitos de 1% (v/v) em solução. De seguida, numa placa de 96 poços prepararam-se diluições sucessivas dos compostos em 1:2, num intervalo de concentrações de 32 a 0,5 µg/mL em PBS, num volume final de 100 µL. Por fim, adicionou-se a suspensão de eritrócitos a 1%, obtendo-se um volume final em cada poço de 200 µL, sendo que como controlo positivo foi usado uma solução de Triton X-100 a 1% (v/v) e como controlo negativo PBS. As placas foram incubadas a 37 °C durante uma hora e após esse tempo centrifugadas a 2000 rpm, 20 °C e durante 10 minutos, seguindo-se a remoção de 100 µL do sobrenadante para uma nova placa e a leitura da sua absorvância a 450 nm. Foram realizados ensaios em duplicado, com um mínimo de três ensaios independentes. A percentagem de hemólise foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\%hemólise = \frac{A_{450}Amostra\ tratada\ com\ composto - A_{450}Branco\ de\ Composto}{A_{450}Amostra\ tratada\ com\ Triton\ X - 100 - A_{450}PBS}$$

Capítulo 6 - Resultados e Discussão

6.1. Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos de síntese derivados do ácido barbitúrico

6.1.1. Suscetibilidade das estirpes *A. baumannii* em estudo aos antibióticos

Os microrganismos estão em constante adaptação ao meio e condições que as rodeiam por desenvolvimento de mutações e transferência de genes. Uma vez que *A. baumannii* não é exceção ao desenvolvimento de resistências, tendo-se tornado um perigo para a saúde pública nos últimos anos, torna-se imperativo realizar esta determinação de suscetibilidade de agentes antimicrobianos, bem como de possíveis alternativas terapêuticas que surjam de forma a escolher a melhor alternativa. Deste modo, de forma a tal ser possível, é necessário a determinação da concentração mínima de um agente antimicrobiano ou composto com potencialidade a ser um, que iniba o crescimento do microrganismo em teste, ou seja a Concentração Mínima Inibitória do agente em estudo. Este ensaio pode ser realizado tanto em meio sólido como meio líquido por diluições sucessivas dos compostos a estudo. O método mais recorrente é a determinação da CMI em meio líquido em microplacas, sendo por isso o método que foi aplicado neste estudo. Após inoculação e incubação das suspensões bacterianas com os compostos, a CMI foi considerada a concentração de composto teste correspondente ao primeiro poço onde não há crescimento bacteriano. Seguidamente ainda se pode determinar a CMB de forma a ter uma ideia do modo de ação dos compostos em teste nas estirpes bacterianas.

Neste trabalho pretendeu-se estudar o efeito antimicrobiano de compostos sintéticos derivados do ácido barbitúrico em *Acinetobacter baumannii* em alternativa ao uso convencional de antibióticos. Para isso começou-se por realizar a determinação da CMI dos antibióticos para duas estirpes de *A. baumannii* de referência (LMG 1025 e LMG 1041) e cinco estirpes recolhidas de isolados clínicos (AcB 13/10, AcB 36/10, AcB 43/10, AcB 44/10 e AcB 73/10). Com o intuito de determinar a suscetibilidade ou resistência das diferentes estirpes que acompanharam o trabalho, foram selecionados seis antibióticos para a determinação da CMI para as diferentes estirpes, uma vez que são os antibióticos usuais no tratamento de infeções por *Acinetobacter baumannii*. Para além disso, sabe-se que são antibióticos a que várias estirpes desta bactéria apresentam resistências, sendo o antibiótico colistina usado como tratamento de último recurso nos hospitais portugueses que é da mesma família da polimixina B aqui usada no ensaio.

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5, relativamente às CMI dos seis antibióticos testados para as sete estirpes de *A. baumannii*, sendo estes: tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina e polimixina B.

Tabela 5: Resultados das CMIs dos antibióticos tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina e polimixina B para as estirpes de *A. baumannii* em estudo.

S - Suscetível; R - Resistente.

Concentração Mínima Inibitória dos Antibióticos (µg/mL)							
	<i>A.baumannii</i> LMG 1025	<i>A.baumannii</i> LMG 1041	AcB 13/10	AcB 36/10	AcB 43/10	AcB 44/10	AcB 73/10
TET	1 (S)	1 (S)	512 (R)	512 (R)	512 (R)	512 (R)	512 (R)
ERY	4 (S)	16 (R)	512 (R)	512 (R)	512 (R)	512 (R)	512 (R)
CHL	32 (R)	64 (R)	64 (R)	128 (R)	64 (R)	64 (R)	64 (R)
CIP	2 (R)	1 (S)	128 (R)	128 (R)	64 (R)	32 (R)	256 (R)
GEN	2 (S)	64 (R)	2 (S)	>512 (R)	>512 (R)	>512 (R)	>512 (R)
POLY B	0,5 (S)	1 (S)	0,5 (S)	1 (S)	1 (S)	1 (S)	0,5 (S)

De forma geral, ao observar-se a Tabela 5 verifica-se que todas as estirpes apresentam resistências a, pelo menos, dois dos seis antibióticos testados. Das estirpes de referência de *A. baumannii* LMG 1025 e LMG 1041, a primeira é a que apresenta os valores de CMI para os antibióticos mais baixos. De entre das cinco estirpes recolhidas em ambiente hospitalar (AcB 13/10, AcB 36/10, AcB 43/10, AcB 44/10 e AcB 73/10), pode verificar-se que a estirpe AcB 73/10 é a que apresenta um perfil de resistência mais notório aos diferentes antibióticos utilizados, uma vez que apresenta os valores de CMI superiores aos verificados para as outras estirpes, ao passo que a estirpe AcB 13/10 é a estirpe clínica que apresenta um perfil fenotípico menos resistente quando comparada com a restantes.

Desta forma, para os ensaios posteriores de forma a se analisarem estirpes com padrões de resistências diferente, selecionou-se a estirpe de referência *A. baumannii* LMG 1025, a estirpe clínica com perfil de resistência a menor número de antibióticos (AcB 13/10) e a estirpe com perfil de resistência mais acentuado (AcB 73/10).

Miyasaki *et al.*, 2010 também determinou a CMI de vários antibióticos para uma estirpe de *A. baumannii* proveniente de um isolamento de uma cultura de sangue de um paciente internado. Os

valores de CMI obtidos para os vários antibióticos estudados indicam que *A. baumannii* apresenta resistências a grande parte dos antibióticos testados, tal como se verificou neste ensaio. Duarte *et al.*, (2012) também determinou a CMI de diversos antibióticos em duas estirpes de *A. baumannii* (LMG 1025 e LMG 1041). A estirpe de *A. baumannii* LMG 1025 apresenta menos resistências aos antibióticos do que a estirpe LMG 1041. Isto comprova a existência de várias resistências aos antibióticos nesta bactéria, tanto em estirpes de referência como isolados clínicos, comprovando-se a necessidade de estudo e desenvolvimento de novas terapias para o combate a infecções causadas por esta bactéria.

6.1.2. Suscetibilidade das estirpes *A. baumannii* em estudo aos compostos em estudo

Seguidamente realizou-se a determinação da CMI dos seis compostos 5-hidraziniletildenopirimidinas sintetizados a partir do ácido barbitúrico nas sete estirpes seleccionadas de *A. baumannii*. Para além de se ter determinado a CMI dos compostos para *A. baumannii*, esta também foi testada para duas outras bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) bem como duas bactérias Gram-positivas (*B. cereus* e *S. aureus*). Aos compostos foi atribuída uma codificação, sendo que serão denominados por **JF20** (1,3-Dimetil-5-(1-(2-(4-nitrofenil) hidrazinil)etilideno)pirimidina-2,4,6-triona), **JF22** (5-(1-(2-(4-nitrofenil)hidrazinil)etilideno) pirimidina-2,4,6-triona), **JF23** (1,3-difenil-5-(1-(2-(4-nitrofenil)hidrazinil)etilideno)-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona), **JF24** (1,3-Dimetil-5-(1-(2-fenilhidrazinil)etilideno)pirimidina-2,4,6-triona), **JF25** (5-(1-(2-fenilhidrazinil)etilideno)pirimidina-2,4,6-triona) e **JF26** (1,3-Difenil-5-(1-(2-fenilhidrazinil)etilideno)-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6-diona) (Tabela 6).

Tabela 6: Valores de CMI's obtidos dos compostos estudados para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* e estirpes de *A. baumannii*.

	Concentração Mínima Inibitória dos Compostos ($\mu\text{g/mL}$)										
	<i>E.</i>	<i>P.</i>	<i>S.</i>	<i>B.</i>	<i>A. baumannii</i>						
	<i>coli</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>aureus</i>	<i>cereus</i>	LMG	LMG	AcB	AcB	AcB	AcB	AcB
ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	LMG	LMG	AcB	AcB	AcB	AcB	AcB	AcB
25922	27853	25923	11778	1025	1041	13/10	36/10	43/10	44/10	73/10	
JF20	>256	>256	>256	>256	16	2	4	8	4	8	32
JF22	>256	>256	>256	>256	2	32	2	2	8	32	4
JF23	>256	>256	>256	>256	4	4	8	32	32	32	16
JF24	>256	>256	>256	>256	8	8	16	16	16	16	8
JF25	>256	>256	>256	>256	4	8	32	16	>32	32	>32
JF26	>256	>256	>256	>256	16	16	32	8	32	8	32

Na Tabela 6, pode-se verificar que os compostos analisados nos intervalos testados apenas apresentaram uma seletividade de atividade antibacteriana para a bactéria *A. baumannii*, pois para as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. cereus*, mesmo subindo as concentrações dos compostos para 256 $\mu\text{g/mL}$, estes não tiveram efeito na inibição do crescimento bacteriano. Os compostos que apresentam um valor de CMI mais constantes entre as sete estirpes de *A. baumannii* testadas foram o JF20, JF22 e JF24, sendo por isso os compostos selecionados para os ensaios seguintes. Comparando as estruturas dos compostos JF20, JF22 e JF24, verifica-se que os compostos JF20 e JF24 possuem dois grupos metil como substituintes, enquanto que o composto JF22 não. Para além disso, os compostos JF20 e JF22 possuem um substituinte nitrilo que o JF24 não possui. Como as alterações principais nas moléculas se encontram nestes substituintes metilo e nitrilo e os compostos que possuem melhor atividade são os que possuem o metilo como substituinte (JF20 e JF24), isto pode indicar que os grupos metil podem contribuir para uma melhor atividade antibacteriana.

O composto JF22 é o que apresenta valores de CMI mais reduzidos (2 $\mu\text{g/mL}$) para o maior número de estirpes (LMG 1025, AcB 13/10 e AcB 36/10), no entanto para a estirpes LMG 1025 e AcB 44/10 o valor de CMI obtida foi de 32 $\mu\text{g/mL}$. Por sua vez, o composto JF24 é o que apresenta os resultados mais constantes de todos os estudados nas diferentes estirpes de *A. baumannii*, isto é 8 $\mu\text{g/mL}$ para as estirpes LMG 1025, LMG 1041 e AcB 73/10 e 16 $\mu\text{g/mL}$ para as estirpes AcB 13/10, AcB 36/10, AcB 43/10 e AcB 44/10.

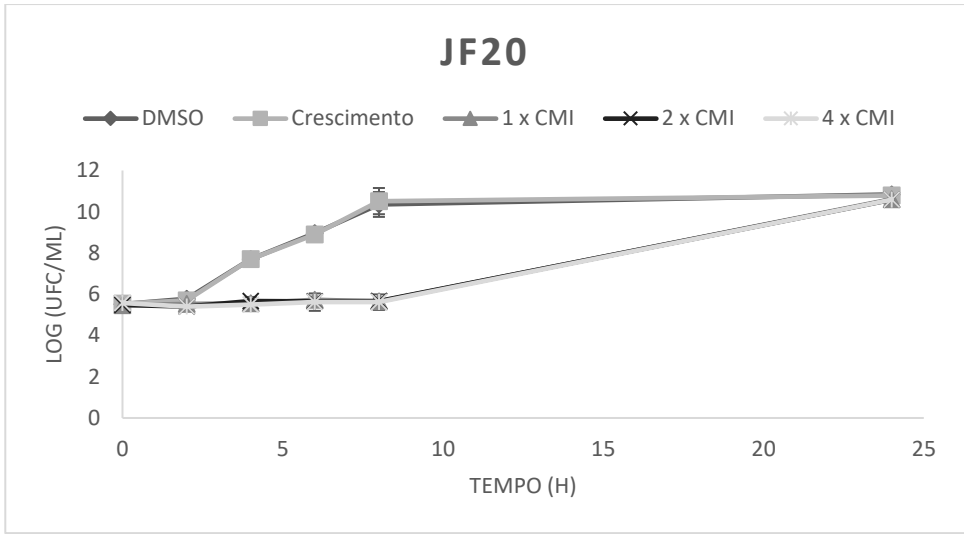
Segundo Yan *et al.*, (2009) em que este testou a atividade antibacteriana de seis compostos 5-benzilideno com uma estrutura semelhante ao composto JF22 na bactéria *S. aureus*, os valores de CMI que se verificaram ($> 12 \mu\text{g/mL}$) foram semelhantes aos aqui verificados, uma vez que não tiveram efeito nesta bactéria, o que pode indicar que os grupos nitrilo e metilo substituintes nas moléculas em estudo podem conferir melhores propriedades antibacterianas.

Não foi possível calcular a Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos compostos para *A. baumannii*, uma vez que o crescimento bacteriano foi superior a 0,01% do inóculo inicial, o que pode indicar que os compostos têm uma ação bacteriostática.

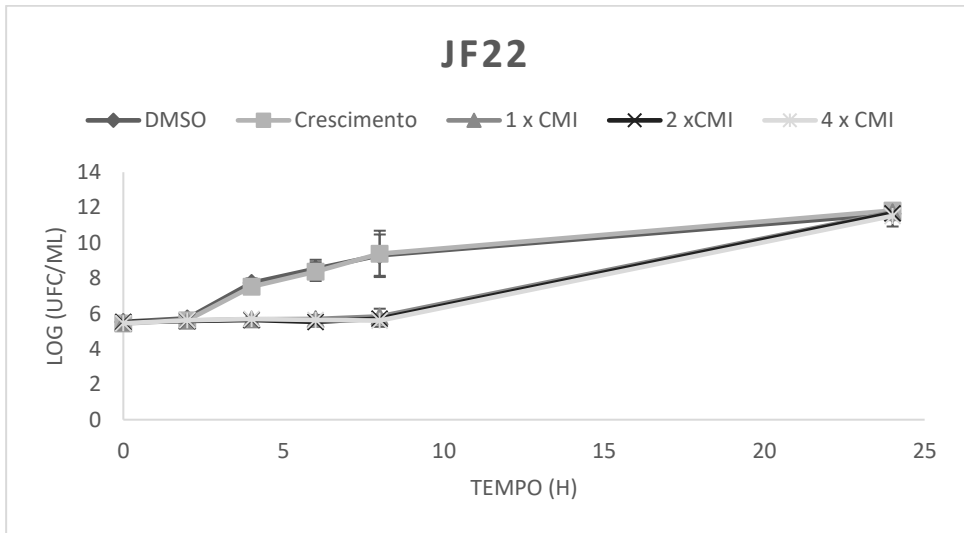
6.2. Ensaio de curvas de morte de células planctônicas com os compostos em teste

O efeito de um agente antimicrobiano sobre a curva de crescimento bacteriana pode ser avaliado calculando a taxa de morte para uma determinada concentração do agente antimicrobiano em condições controladas. Este ensaio denomina-se por Curvas de Morte, devido à representação gráfica desta taxa e é determinada pela medição do número de bactérias viáveis aquando de medições ao longo do tempo de ensaio. Procedeu-se à determinação das Curvas de Morte das estirpes de *A. baumannii* LMG 1025, AcB 13/10 e AcB 73/10 na presença dos compostos em teste JF20, JF22 e JF24.

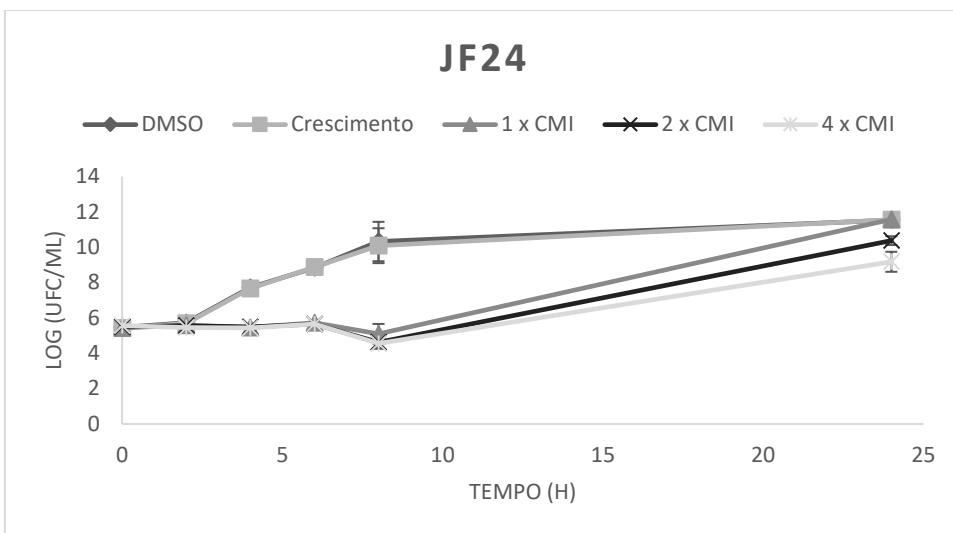
De uma forma geral, verificou-se que os compostos a JF20, JF22 e JF24 têm um efeito bacteriostático em todas as concentrações testadas, tal como se pode verificar nas Figuras 4, 5 e 6. Para a estirpe de referência de *A. baumannii* LMG 1025, pode-se verificar na Figura 4 que todos os compostos apresentam um efeito bacteriostático em todas as concentrações até às 8 horas de ensaio, havendo depois uma recuperação de crescimento bacteriano às 24 horas, o que pode indicar uma perda de atividade dos compostos. Verifica-se que o composto JF24 é o que apresenta uma diminuição mais acentuada do crescimento bacteriano e uma recuperação deste às 24 horas mais reduzida na concentração de 4 x CMI.



(a)



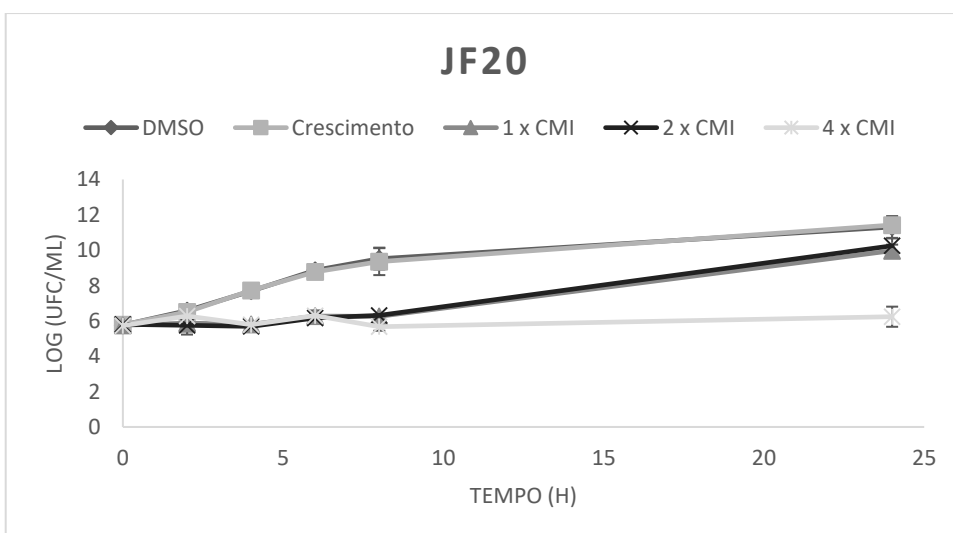
(b)



(c)

Figura 4: Curvas de morte para a estirpe de *A. baumannii* LMG 1025, para os compostos de síntese (a) JF20, (b) JF22 e (c) JF24.

Quando os compostos em estudo foram testados no isolado clínico de *A. baumannii* AcB 13/10, pode verificar-se que o perfil de crescimento é semelhante ao obtido para a estirpe LMG 1025, em que se observa uma inibição do crescimento até às 8 horas de ensaio havendo uma recuperação do crescimento às 24 horas para os compostos JF20 e JF22. As curvas obtidas sugerem que os compostos estudados tenham propriedades bacteriostáticas. Novamente o composto JF24 apresenta um efeito melhor que os restantes compostos, onde não há recuperação do crescimento bacteriano ao fim das 24 horas em nenhuma das três concentrações. É ainda de salientar que o composto JF20 na concentração de 4 x CMI teve o mesmo efeito bacteriostático ao longo de todo o ensaio.



(a)

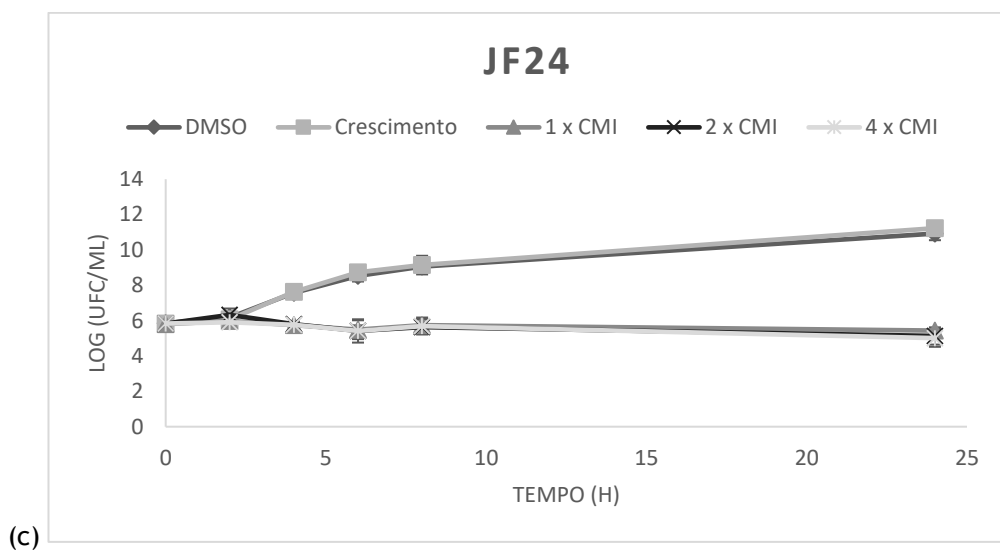
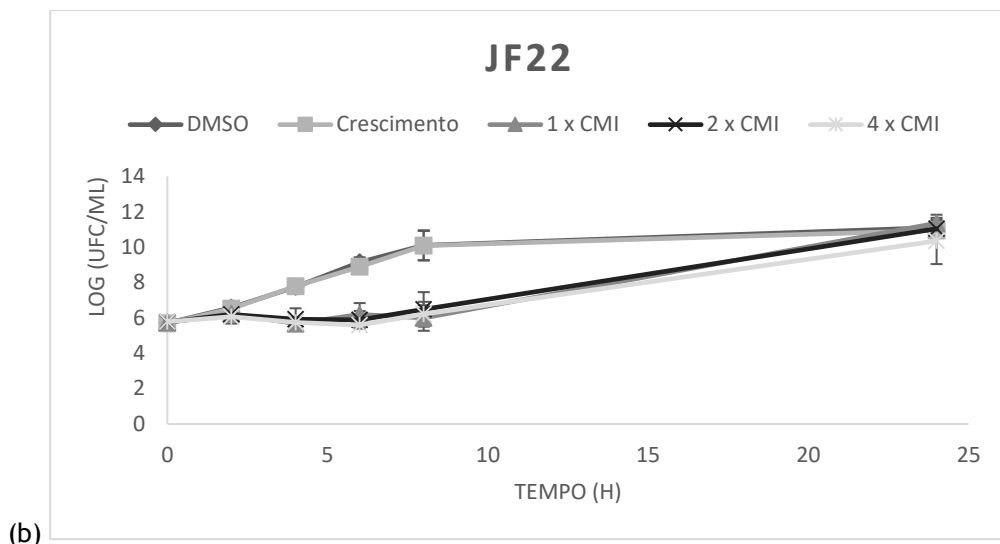
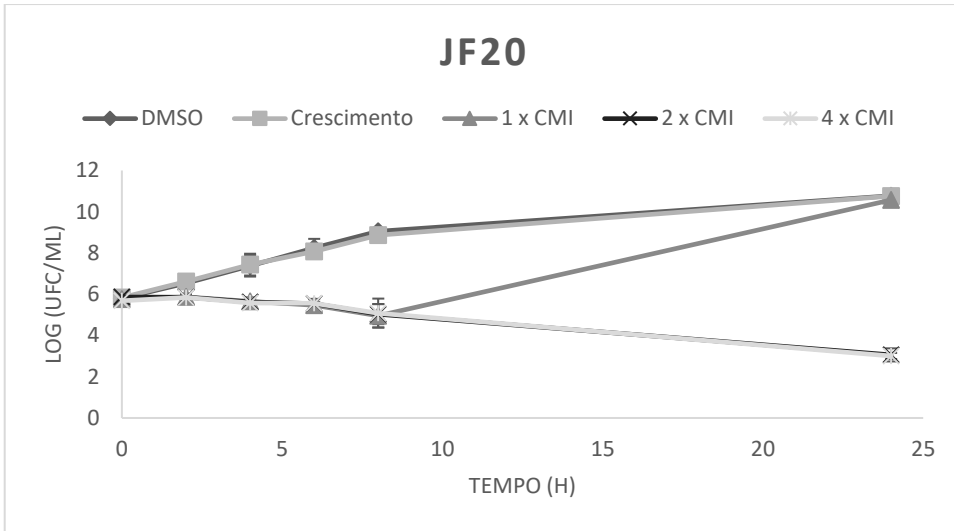
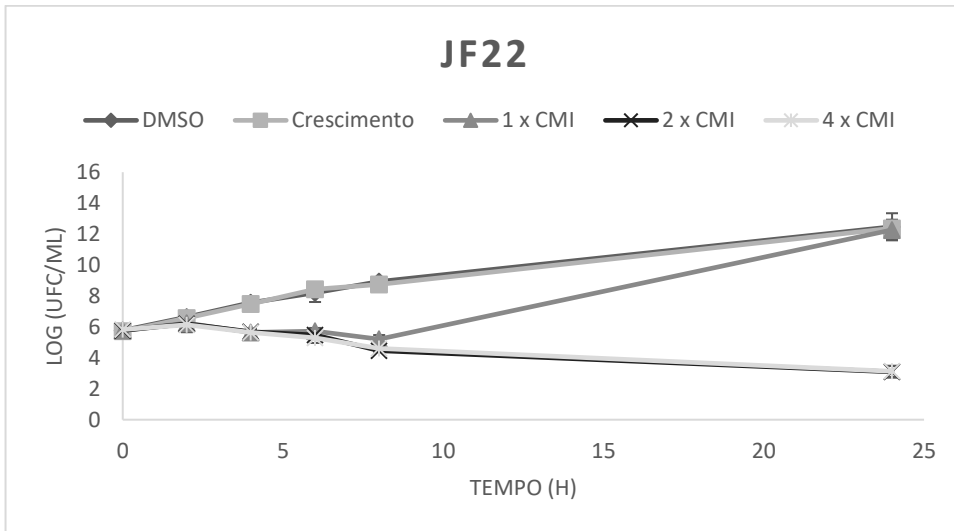


Figura 5: Curvas de morte para a estirpe de *A. baumannii* AcB 13/10 para os compostos de síntese (a) JF20, (b) JF22 e (c) JF24.

Por sua vez, nos ensaios realizados para a estirpe de *A. baumannii* AcB 73/10, pode verificar-se na Figura 6 que os compostos são mais eficazes na inibição do crescimento bacteriano, uma vez que apenas para o composto JF24 nas concentrações 1 x e 2 x CMI há uma recuperação do crescimento bacteriano às 24 horas, tendo as restantes horas e compostos mantido o perfil bacteriostático ao longo de todo o ensaio. Para esta estirpe o composto que aparenta ter um melhor efeito é o JF20, chegando a haver uma ligeira diminuição do crescimento bacteriano às 24 horas em vez deste se manter constante.



(a)



(b)

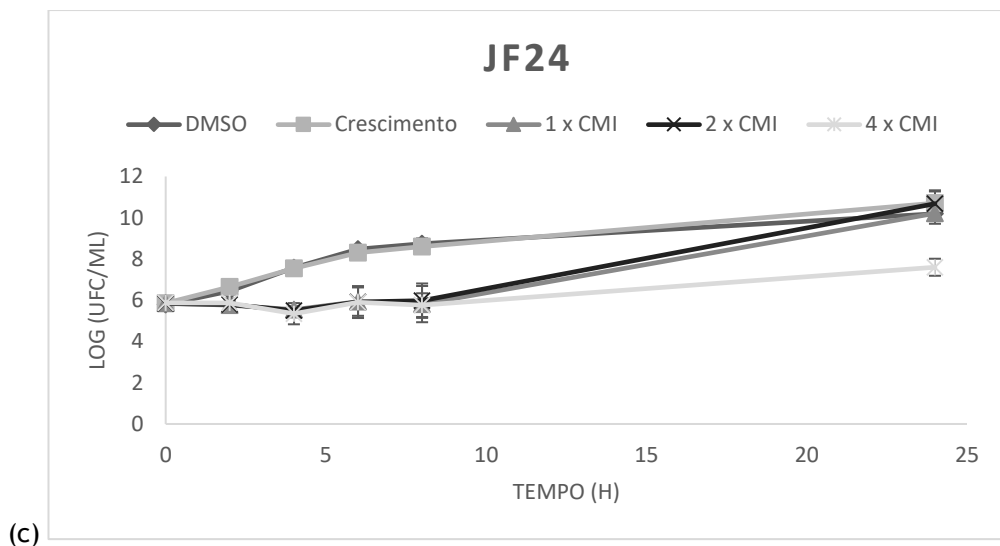


Figura 6: Curvas de morte para a estirpe de *A. baumannii* AcB 73/10, para os compostos de síntese (a) JF20, (b) JF22 e (c) JF24.

É ainda possível verificar que, quando comparando as Figuras 4, 5 e 6 entre si, que há uma maior suscetibilidade das estirpes clínicas *A. baumannii* AcB 13/10 e AcB 73/10 aos compostos quando comparadas com a estirpe de referência *A. baumannii* LMG 1025, o que indica que globalmente as estirpes clínicas e, em particular a estirpe mais resistente AcB 73/10, são mais suscetíveis aos compostos em estudo neste trabalho.

Segundo, Gaidhane *et al.*, (2016) os barbituratos apresentam várias atividades biológicas incluindo atividade bacteriostática no crescimento bacteriano. Uma vez que novamente não há ensaios que demonstrem a atividade dos compostos de síntese derivados de ácido barbitúrico na curva de crescimento de *A. baumannii*, nos ensaios realizados por Kang *et al.*, (2015) em *E. coli*, o que se observa é um efeito bactericida dos compostos derivados do ácido barbitúrico. Por sua vez um efeito bactericida semelhante é verificado nos ensaios realizados por Sharma *et al.*, (2017) realizados em estirpes multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli*. Também nos ensaios desenvolvidos por Singh *et al.*, (2016) em *S. aureus* e *E. coli*, os compostos derivados do ácido barbitúrico que foram estudados também apresentam uma cinética de morte bactericida ao invés de bacteriostática com uma taxa de morte entre 90 a 99% na concentração de 4 x CMI. Desta forma, os resultados experimentais já publicados com utilização de derivados de ácido barbitúrico em diversos microrganismos é que estes provocam um efeito bactericida, o que é diferente do verificado no presente trabalho em que os derivados de ácido barbitúrico estudados em *A. baumannii* evidenciaram um efeito bacteriostático. As diferenças de resultados entre os ensaios os aqui demonstrados e obtidos pelo grupo de Singh *et al.*, (2016) pode residir nas diferenças estruturais da molécula, uma vez que neste estudo a molécula base que foi alterada foi o núcleo de benzotiazole.

6.3. Clivagem do plasmídeo pUC 18-K2 pelos compostos em teste

O ADN bacteriano é onde se encontra toda a informação necessária para a sobrevivência do microrganismo. Para além do ADN as bactérias possuem ainda, na maioria das vezes, plasmídeos que lhes conferem vantagens adaptativas, tais como resistência a antibióticos, havendo a ainda possibilidade de transferência de genes de interesse entre bactérias via plasmídeo (Lee *et al.*, 2017a). Desta forma, compostos que atuem a nível do ADN bacteriano ou plasmídico serão importantes no combate contra bactérias patogénicas, nomeadamente *A. baumannii*.

Como forma de verificar se os compostos derivados de barbituratos selecionados para os ensaios de curvas de morte atuam no ADN bacteriano, por ligação ou por clivagem deste, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pUC18-K2 após incubação com diferentes concentrações dos compostos.

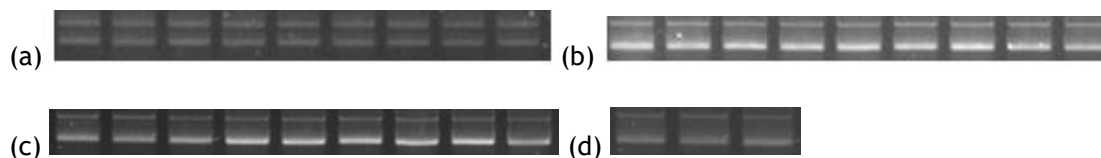


Figura 71: Clivagem do plasmídeo pUC 18-K2 pelos Compostos JF20 (a), JF22 (b), JF24 (c) e controlo de DMSO, pADN 37 °C e pADN 4 °C ADN (d).

Através dos resultados apresentados na Figura 7 pode-se verificar que o mecanismo de ação dos compostos não parece residir na degradação do ADN bacteriano, uma vez que não há a presença de mais nenhuma banda para além das duas que aparecem nos controlos de DMSO e de plasmídeo a diferentes temperaturas. Para este ensaio foi utilizado um plasmídeo devido ao facto de este possuir três isoformas diferentes (superenrolada, circular aberta e linear) e, conseqüentemente, ser possível através da visualização num gel de agarose determinar qual a isoforma mais presente. Neste caso, apenas verificamos duas bandas em todos os ensaios, o que correspondem às isoformas circular aberta e superenrolada, respetivamente. É possível ainda verificar que em nenhum dos compostos ou concentrações estudadas há um aumento ou diminuição da intensidade da banda na eletroforese, sugerindo que os compostos não se ligam ao plasmídeo em nenhuma das conformações, pois se tal acontecesse uma das bandas apareceria com maior intensidade no gel de agarose. Por sua vez, se os compostos degradassem o plasmídeo usado, o que se verificaria no gel seria o aparecimento de um maior número de bandas do que as verificadas no controlo de plasmídeo.

Segundo os ensaios realizados por Singh *et al.*, (2016), os compostos derivados de ácido barbitúrico por modificações do núcleo de benzotiazole são capazes de se ligar, bem como de degradar o ADN bacteriano, não havendo uma especificidade de afinidade de ligação ao local da cadeia de ADN. No entanto, nos ensaios realizados por Dhorajiya *et al.*, (2014), estes reportam que os compostos derivados do ácido barbitúrico possuem um efeito protetor no ADN, daí que possa ser esta a explicação para que o mecanismo de ação dos compostos de síntese derivados de barbitúricos aqui estudados não seja por ligação ou degradação do ADN bacteriano.

6.4. Ensaio de acumulação de brometo de etídeo

Devido ao uso indiscriminado dos antibióticos o aumento de resistências bacterianas tem vindo a aumentar ao longo das últimas décadas, incluindo por parte da bactéria *Acinetobacter baumannii*. As bactérias têm desenvolvido estratégias como desenvolvimento de enzimas que degradam os antibióticos, alteração dos alvos de ação dos agentes terapêuticos, diminuição da permeabilidade membranar, modificações no número e estrutura de porinas e, por fim, sobre expressão de bombas de efluxo. Nas células de *A. baumannii*, as bombas de efluxo têm um papel importante na extrusão do fármaco do interior da célula, sendo por isso necessário aumentar a concentração de fármaco administrada, o que pode ter consequências no organismo hospedeiro (Peleg, Adams and Paterson, 2007; Lee *et al.*, 2017a). Devido a esta problemática pretendeu-se estudar o efeito dos compostos sintéticos derivados de barbituratos na inibição das bombas de efluxo de *A. baumannii*, usando-se como modelo a estirpe de referência LMG 1025.

Este ensaio consiste na medição da fluorescência ao longo do tempo, usando como base do ensaio o facto de o BrEt ser substrato das bombas de efluxo, assim este consegue entrar nas células bacterianas, intercalando com o ADN bacteriano e emitindo fluorescência. No caso de os compostos de síntese derivados de barbituratos em estudo inibirem as bombas de efluxo em *A. baumannii*, o que se verificaria seria a presença de uma curva de fluorescência superior o controlo com células. Neste ensaio foram utilizadas duas concentrações ($\frac{1}{2}$ x e 1 x CMI) dos compostos JF20, JF22 e JF24 e as fluorescências correspondentes comparadas à obtida para as células com brometo de etídeo. Realizou-se também um controlo de fluorescência de células, de DMSO e de compostos para verificar se há fluorescência intrínseca às células, solvente ou compostos. Os resultados obtidos neste ensaio encontram-se representados na Figura 8.

Com a comparação da fluorescência correspondente à internalização do BrEt das células de *A. baumannii* incubadas com PABN ou com os diferentes compostos derivados de barbituratos, o que se verificou foi que nenhum dos compostos nas concentrações de $\frac{1}{2}$ x CMI ou 1 x CMI apresenta uma intensidade de fluorescência superior ao EPI PABN, o que nos indica que há uma maior

internalização de BrEt e que as bombas de efluxo não foram inibidas. Deste modo, pode-se dizer que os compostos não inibem as bombas de efluxo bacterianas nas condições deste ensaio. Por sua vez a curva de fluorescência do DMSO encontra-se muito abaixo da curva de controlo de células, o que pode sugerir que este solvente atue sobre as bombas de efluxo aumentando a sua atividade ou que provoque danos na célula formando poros que permitem a extrusão do BrEt. Por outro lado, uma vez que a curvas de fluorescência do controlo de células e inibidor de bombas de efluxo estão muito próximas, este último pode não estar a atuar como seria esperado.

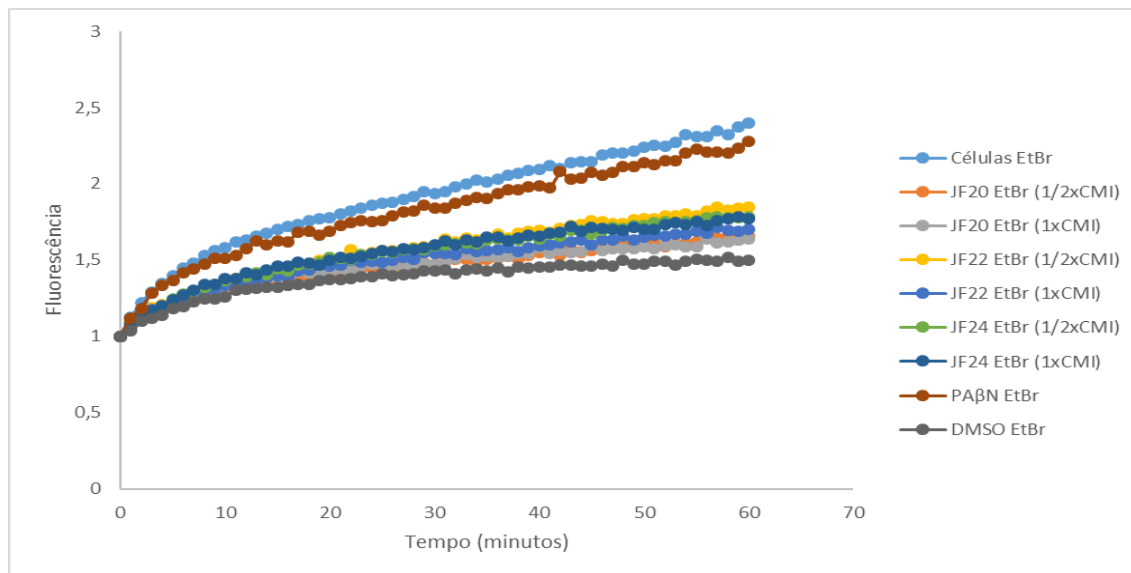


Figura 8: Resultados do ensaio de acumulação de BrEt para a estirpe de *A. baumannii* LMG 1025.

Segundo os ensaios realizados na patente WO 2005113579 A1 - “*Bacterial efflux pump inhibitors and methods of treating bacterial infections*”, verificou-se que, os compostos derivados do ácido barbitúrico têm potencial para inibição de bombas de efluxo bacterianas, mesmo em estirpes bacterianas com multirresistências. No entanto, os compostos em estudo no presente trabalho quando aplicados à estirpe...não mostraram capacidade de inibição das bombas de efluxo.

6.5. Modulação da resistência de antibióticos

As resistências microbianas são um problema nas unidades hospitalares, principalmente em pacientes com o sistema imunitário debilitado quer por hospitalização prolongada, terem sido sujeitos a cirurgias ou por possuírem doenças crônicas. Deste modo, encontrar compostos com a

capacidade de reverterem estas resistências por administração conjunta com os agentes antibacterianos já em uso é uma boa estratégia, pois permite uma terapia mais eficiente e, conseqüentemente, melhorar as condições do paciente (Voukeng, Beng and Kuete, 2016). Assim, neste estudo avaliou-se o efeito que os derivados de barbituratos em estudo têm, quando aplicados em concentrações subinibitórias em conjunto com os antibióticos tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina e gentamicina. Esta estratégia aqui aplicada já é usada para testar combinações de antibióticos, de forma a determinar quais as combinações de antibióticos mais eficazes na redução de resistências bacterianas. Este ensaio foi realizado nas três estirpes de *A. baumannii* previamente selecionadas (estirpe de referência LMG 1025 e dois isolados clínicos com perfil de resistência AcB13/10 e AcB 73/10) com o objetivo de verificar o efeito dos compostos teste em estirpes com diferentes perfis de resistência, quando administrados conjuntamente com os antibióticos.

Como se pode ver na Tabela 7, aquando da utilização de uma concentração de $\frac{1}{4}$ x CMI dos compostos verificou-se que para a estirpe de referência de *A. baumannii* LMG 1025 o composto mais eficaz é o JF20, reduzindo o valor de CMI para todos os antibióticos testados; para a estirpe AcB 13/10 o composto JF24 reduziu o valor de CMI dos cinco antibióticos e que, por fim, para a estirpe AcB 73/10 nenhum dos compostos conseguiu reduzir a CMI dos antibióticos.

Tabela 7: Tabela resumo do ensaio de modulação com os compostos JF20, JF22 e JF24.

Ab - antibiótico

MIC dos Antibióticos para <i>A. baumannii</i> (µg/mL)												
	LMG1025				AcB 13/10				AcB 73/10			
	Ab	+JF20	+JF22	+JF24	Ab	+JF20	+JF22	+JF24	Ab	+JF20	+JF22	+JF24
TET	1	0,125	0,5	0,5	512	512	512	256	512	512	512	512
ERI	4	2	4	4	512	512	512	256	512	>512	>512	512
CHL	32	16	32	32	64	64	64	32	64	64	64	64
CIP	2	0,125	0,125	0,25	128	64	128	32	256	>512	256	256
GEN	2	0,5	2	0,25	2	1	8	1	>512	>512	>512	>512

Por sua vez, quando se fala de ensaios de modulação de resistência aos antibióticos com uma aplicação conjunta de antibióticos com compostos derivados do ácido barbitúrico, Kumar *et al.*, (2014) sugerem que há um efeito de redução dos valores de CMI no fungo *Aspergillus fumigatu*, aquando desta administração conjunta, passando-se de um valor de CMI de 39,33 para 25 µg/mL

quando combinando um dos seus compostos de síntese derivados do ácido barbitúrico com o antifúngico azol. Isto pode acontecer devido ao facto de haver diferentes moléculas interagindo entre si, provocado um aumento da disponibilidade de antibiótico. Apesar dos ensaios em compostos derivados do ácido barbitúrico terem sido realizados em fungos e não em bactérias, torna-se evidente a vasta possibilidade de aplicação destes compostos e semelhantes, uma vez que aparentam modular a resistência microbiana.

6.6. Avaliação da inibição do processo de *Quorum-sensing*

O processo de *quorum-sensing* (QS) é uma estratégia bacteriana de comunicação célula-célula, sendo importante na sobrevivência bacteriana, bem como no processo de formação do biofilme bacteriano. QS controla o crescimento da população bacteriana consoante as condições ambientais e nutrientes existentes. No caso específico de *A. baumannii*, foi descrito que tanto estirpes ambientais como estirpes de isolados clínicos possuem a capacidade de produzir moléculas sinalizadoras de QS, controlando a adesão celular, formação de biofilmes e ainda diversos fatores de virulência (Castillo-Juárez *et al.*, 2015). Devido a esta problemática é importante estudar se os compostos sintéticos em estudo inibem o processo de QS, o que implica que tenham atuação a nível da comunicação celular. Esta inibição é possível ver-se a olho nú através de um ensaio de difusão em agar com recurso à bactéria biossensor *Chromobacterium violaceum* produtora do pigmento roxo, violaceína.

Na Figura 9 pode visualizar-se os diferentes resultados para o ensaio de QS para os diferentes compostos, verificando-se que nenhum dos seis compostos sintéticos derivados de barbituratos apresenta uma inibição do processo de QS, pois não há a presença de um halo correspondente à inibição de produção do pigmento violaceína.



Figura 9: Halos de inibição de crescimento bacteriano e de produção de violaceína para o Resveratrol e dos compostos JF20, JF22 e JF24 em estudo.

Neste ensaio de difusão a estirpe biossensor usada foi a *C. violaceum* ATCC 12472 e, tal como evidenciado na Tabela 8, o resveratrol produziu halos tanto de inibição de crescimento como de produção de pigmento em volta dos discos, o que indica uma inibição concomitante do crescimento bacteriano e da produção de violaceína. Como nenhum dos compostos em estudo produziu um halo em redor do disco, pode-se concluir que não há Inibição de QS.

Tabela 8: Atividade anti-QS dos compostos em estudo e resveratrol, usando *C. violaceum* ATCC 12472.

	Zonas de Inibição contra <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 (diâmetro em mm)		
	Crescimento + Inibição de pigmento (d ₁)	Inibição de crescimento (d ₂)	Inibição de QS (d ₁ -d ₂)
JF20	0	0	0
JF22	0	0	0
JF23	0	0	0
JF24	0	0	0
JF25	0	0	0
JF26	0	0	0
Resveratrol	25,33	17,33	8,00

Nos ensaios realizados com compostos derivados do ácido barbitúrico (ácido 2,5-Dieti barbitúrico, 5-Butil-5-etil-1,3-diazinane-2,4,6-triona e 5-Etil-5-isopropilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona), Ramos *et al.*, (2014), verificou que em *P. aeruginosa* há uma redução do processo de QS devido à homologia entre moléculas derivadas do ácido barbitúrico dificultando o seu normal funcionamento por competição e as moléculas de N-acilhomoserina lactonas, acontecimento esse que não se verifica nos ensaios aqui apresentados.

6.7. Avaliação do *swimming* bacteriano na presença dos compostos em teste

Acinetobacter spp. é descrito como um género cujas bactérias são desprovidas de motilidade, no entanto alguns estudos indicam que algumas destas bactérias apresentam motilidade no início da

fase logarítmica de crescimento, provavelmente devido à presença de fímbrias, o que lhe confere motilidade. Este fenómeno de mobilidade bacteriana está associado à formação de biofilmes e, para isso, compostos capazes de inibir este fenómeno são importantes fármacos. Desta forma, para avaliar se este microrganismo apresenta motilidade, utilizaram-se as três estirpes previamente selecionadas (estirpe de referência LMG 1025 e os dois isolados clínicos AcB 13/10 e AcB 73/10). Para verificar se tal acontece com os compostos em teste neste estudo, utilizaram-se placas de agar suplementadas com 0,3 % e com duas concentrações subinibitórias ($\frac{1}{2}$ x e $\frac{1}{4}$ x CMI) dos três compostos previamente selecionados (JF20, JF22 e JF24).

Com este ensaio, e tal como evidenciado na Tabela 9, pode-se verificar que apenas a estirpe de referência apresenta motilidade quando comparada com as estirpes clínicas AcB 13/10 e AcB 73/10. Verifica-se ainda que, quando comparado com os controlos sem composto que há uma diminuição nos halos de *swimming* em todas as concentrações e compostos testados, sendo mais visível para a estirpe de *A. baumannii* LMG 1025.

Tabela 9: Resumo do ensaio de motilidade de *A. baumannii*.

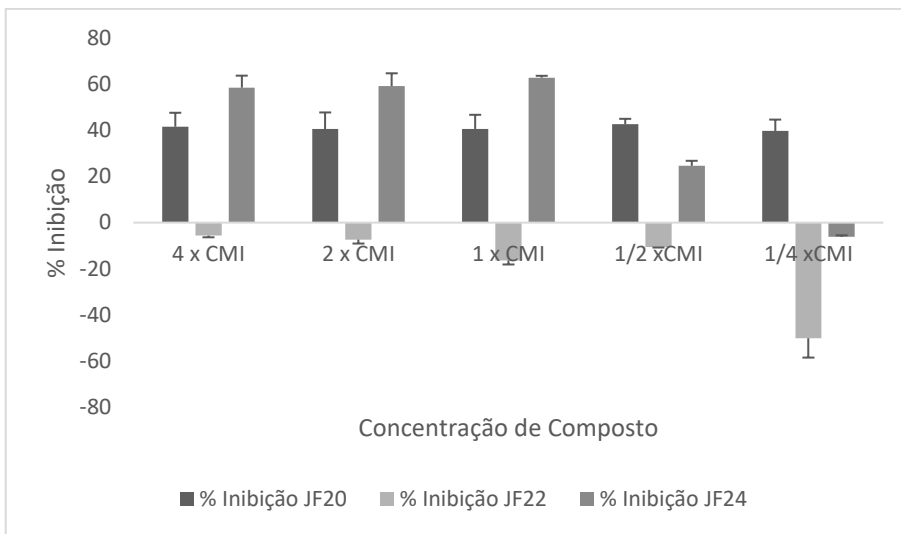
Halos de <i>swimming</i>				
	Composto ($\frac{1}{4}$ x CMI)	Halo (mm)	Composto ($\frac{1}{2}$ x CMI)	Halo (mm)
LMG 1025 (20,0 mm ± 3,6)	+ JF20	5,0 ± 3,3	+ JF20	18,0 ± 5,4
	+ JF22	8,8 ± 6,4	+ JF22	12,3 ± 8,7
	+ JF24	23,0 ± 9,5	+ JF24	13,8 ± 4,6
AcB 13/10 (7,3 mm ± 1,0)	+ JF20	6,2 ± 1,9	+ JF20	6,5 ± 2,4
	+ JF22	6,3 ± 2,5	+ JF22	6,2 ± 2,8
	+ JF24	6,5 ± 2,3	+ JF24	7,8 ± 3,4
AcB 73/10 (6,8 mm ± 1,2)	+ JF20	5,0 ± 2,4	+ JF20	5,8 ± 1,8
	+ JF22	6,0 ± 2,6	+ JF22	5,3 ± 2,6
	+ JF24	6,0 ± 2,3	+ JF24	6,0 ± 1,9

Quanto aos ensaios realizados com compostos derivados do ácido barbitúrico, White, Nicoletti and Borland, (2014), verificou que estes compostos, apesar de não serem estruturalmente semelhantes aos aqui estudados, possuem a capacidade de inibir a motilidade bacteriana em duas estirpes de *Proteus* spp. à semelhança do que acontece nos ensaios aqui estudados em *A. baumannii*.

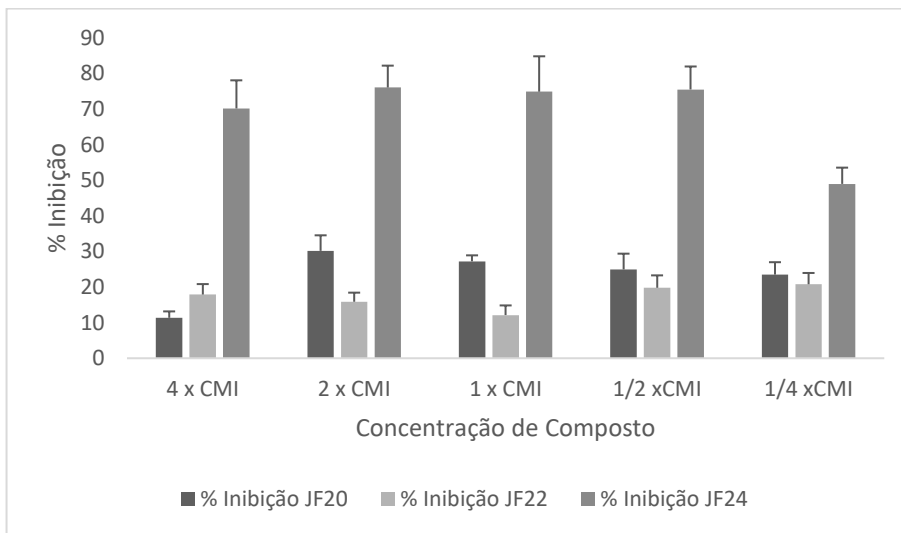
6.8. Avaliação do efeito dos compostos em teste na inibição da formação de biofilmes

Os biofilmes são definidos como comunidades de microrganismos que existem envoltas numa matriz extracelular de biomoléculas. As bactérias possuem a capacidade de aderirem e crescerem em superfícies inanimadas, tais como solos e sistemas aquáticos, mas também em superfícies hospitalares e materiais médicos como cateteres e próteses. *A. baumannii* é uma bactéria que consegue produzir biofilmes e estes são considerados importantes fatores de virulência nesta bactéria (Longo, Vuotto and Donelli, 2014). Segundo Su *et al.*, (2011), os biofilmes permitem o aumento do tempo de vida da bactéria mesmo em condições adversas, e estão associados a um aumento de 1000 vezes no desenvolvimento de resistências aos antibióticos tradicionais. Estão frequentemente associados a estirpes provenientes de isolados clínicos e associados ao desenvolvimento de patologias em hospedeiros humanos uma vez que possuem a capacidade de formar biofilmes em superfícies hospitalares. Desta forma, ao se inibir a formação de biofilmes por esta bactéria supõe-se que haja uma diminuição de patologias causadas por esta bactéria, bem como um aumento do tempo de vida útil de certos instrumentos hospitalares e cirúrgicos. Desta forma, para comprovar a eficácia dos compostos em estudo na inibição do processo de formação de biofilmes pela bactéria *A. baumannii*, procedeu-se à avaliação do efeito dos três compostos em teste nas três estirpes selecionadas. Os resultados obtidos encontram-se esquematizados na Figura 10.

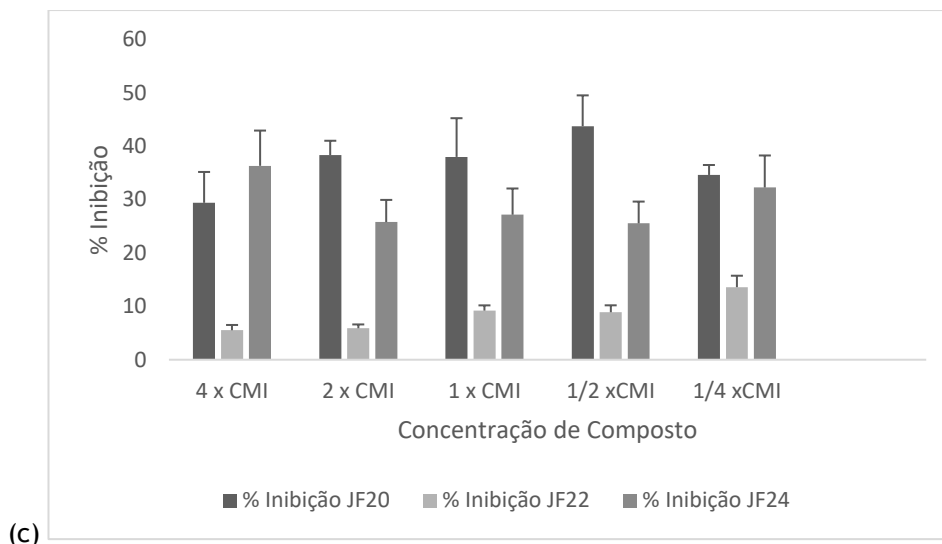
De uma forma geral, verificou-se que o composto JF24 possui um efeito evidente na inibição de formação dos biofilmes para as três estirpes testadas, ou seja, *A. baumannii* LMG 1025, AcB 13/10 e AcB 73/10 na gama de concentrações de 4 x a 1/2 x CMI. No entanto, para a estirpe de referência (Figura 10 (a)) a concentração que apresentou melhores resultados na inibição da formação de biofilmes foi a 1 x CMI, que provocou uma inibição de cerca de 63%. É ainda de salientar que o composto JF22 para esta estirpe teve um efeito de indução da formação de biofilmes, atingindo esta um valor máximo de 50% para a concentração mais baixa. Para os isolados clínicos, há uma diminuição da formação de biofilmes bacterianos em todos os compostos e concentrações. De uma forma mais específica, para a estirpe de *A. baumannii* AcB 13/10 a inibição de formação de biofilmes foi mais evidente com o composto JF24, à semelhança da estirpe anterior, na concentração de 2 x CMI, com uma percentagem de inibição de aproximadamente de 76%. É importante referir que para este composto as concentrações de 4 x até 1/2 x CMI apresentam percentagens de inibição muito semelhantes (na ordem dos 70%) e que a percentagem de inibição de formação de biofilmes mais reduzida foi de 11% para o composto teste JF20, 4 x CMI. Por sua vez, para a estirpe de *A. baumannii* AcB 73/10 a inibição foi de aproximadamente 43% para a concentração de 4 x CMI do composto JF20.



(a)



(b)



(c) Figura 10: Resultados do ensaio de inibição de formação de biofilmes pelos compostos teste paras as estirpes de *A. baumannii* LMG 1025 (a), AcB 13/10 (b) e AcB 73/10 (c).

Foi ainda possível observar que a estirpe de referência *A. baumannii* LMG 1025 ($DO_{570\text{ nm}} = 0,275 \pm 0,049$) é a estirpe que mais produz biofilmes quando comparado com as duas estirpes de isolados clínicos, e que a estirpe clínica AcB 73/10 ($DO_{570\text{ nm}} = 0,197 \pm 0,038$) era menor formadora de biofilmes apesar de ser a estirpe mais resistente aos antibióticos, quando comparando com as duas outras estirpes.

Apesar de não haverem estudos de inibição de formação de biofilmes com compostos de síntese derivados do ácido barbitúrico em *A. baumannii*, a patente WO 2014042647 A1 - “*Medicinal drug with activity against gram positive bacteria, mycobacteria and fungi*” indica que estes compostos inibem a formação de biofilmes em estirpes de *S. aureus* suscetíveis e resistentes à Meticilina (estirpes ATCC 29213, MRSA 24/31 e MRSA 201/010), bem como de alguns fungos.

6.9. Avaliação da atividade hemolítica dos compostos

Um agente antimicrobiano ideal é capaz de inibir em doses reduzidas vias metabólicas essenciais bacterianas, reduzindo assim o seu crescimento. Estes compostos não devem apresentar citotoxicidade para outras células que não as bacterianas, isto é, a sua ação deve ser única e exclusivamente na célula bacteriana e não atuar nas células do organismo hospedeiro (Azevedo, 2014). Desta forma é importante a realização de testes de citotoxicidade, tais como ensaios de atividade hemolítica dos compostos. Para comprovar a ausência de atividade hemolítica e, desta forma, comprovar a ausência de citotoxicidade para as células do organismo humano por parte dos

compostos sintéticos em estudo derivados do ácido barbitúrico, procedeu-se a um ensaio de hemólise de eritrócitos humanos em placas de 96 poços.

Foi realizado um ensaio de atividade hemolítica dos compostos através da incubação dos compostos com hemácias humanas, de forma a verificar se estes promoviam a hemólise, o que seria indicativo de que os compostos apresentavam atividade hemolítica. A concentração máxima de 32 µg/mL no ensaio de atividade hemolítica foi assim selecionada, uma vez que foi a concentração máxima utilizada no ensaio de determinação de CMI dos compostos. Deste modo pode-se considerar que os compostos na gama de concentrações aplicadas não apresentam toxicidade. Foi realizado um branco de DMSO de forma a comprovar que a presença ou ausência de toxicidade se devia exclusivamente aos compostos e não a este solvente.

Verificou-se que, para concentrações iguais ou inferiores a 32 µg/mL os compostos não lisavam as hemácias humanas, uma vez que se verificou que a percentagem de hemólise mais elevada foi de 9% para o composto JF22 na concentração de 16 µg/mL.

Tabela 10: Resultados do ensaio de atividade hemolítica dos compostos em teste.

Composto	% Hemólise						
	Concentração (µg/mL)						
	32	16	8	4	2	1	0,5
JF20	≈0 ± 0,09	≈0 ± 0,04	5 ± 0,02	5 ± 0,01	8 ± 0,03	2 ± 0	3 ± 0,01
JF22	8 ± 0,02	9 ± 0,02	4 ± 0,02	3 ± 0,02	2 ± 0	≈0 ± 0	≈0 ± 0
JF24	5 ± 0,02	≈0 ± 0	≈0 ± 0	≈0 ± 0	≈0 ± 0	≈0 ± 0	≈0 ± 0
JF26	1 ± 0,02	≈0 ± 0	≈0 ± 0	≈0 ± 0	≈0 ± 0	≈0 ± 0	≈0 ± 0

Nos ensaios realizados por The, 1942, verificou-se aquando da realização de ensaios de hemólise em sangue de ovelha que, quanto maior o número de átomos de carbono presentes na molécula, menos tempo é necessário para que ocorra hemólise. Esta justificação não aparenta explicar as percentagens de hemólise apresentadas pelo composto uma vez que o composto JF26 é o que apresenta maior número de átomos de carbono, uma vez que possui três grupos fenil como substituintes, dois na parte superior da molécula (Figura 11) e um na parte inferior e uma percentagem de hemólise de 1% na concentração de 32 µg/mL. Por sua vez, o mesmo não se verifica com os compostos JF20 e JF22, que mesmo tendo percentagens de hemólise baixas, são as mais altas dos ensaios. Estes compostos derivados do ácido barbitúrico não possui os dois substituintes fenil na parte superior da molécula, possuem em vez disso um grupo nitrilo ligado ao fenil.

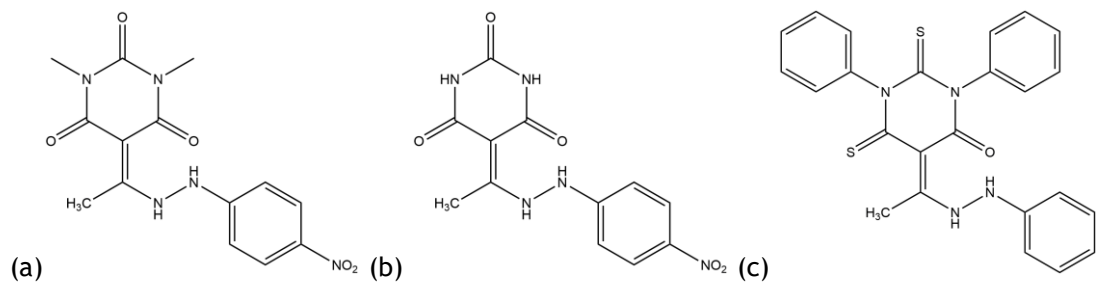


Figura 11: Estrutura dos compostos (a) JF20, (b) JF22 e (c) JF26.

Capítulo 7 - Conclusões e Perspetivas

Futuras

Os ensaios realizados ao longo deste trabalho levaram a um melhor entendimento das propriedades antibacterianas dos seis compostos de síntese derivados do ácido barbitúrico que foram utilizados nos diferentes ensaios, tanto em estirpes de referência de *Acinetobacter baumannii* como em isolados clínicos deste microrganismo com múltiplas resistências aos antimicrobianos. Para além da propriedade antibacteriana dos compostos, foi ainda avaliada a sua capacidade de se ligar ao ADN bacteriano, atividade na inibição das bombas de efluxo, inibição de formação de biofilmes, capacidade de reduzir a CMI dos antibióticos, inibição de *quorum-sensing*, inibição de motilidade bacteriana e determinação da atividade hemolítica. As principais conclusões do trabalho realizado foram as seguintes:

- Foi avaliada a suscetibilidade de duas estirpes de referência de *A. baumannii* (LMG 1025 e LMG 1041) e de cinco isolados clínicos (AcB 13/10, AcB 36/10, AcB 43/10, AcB 44/10 e AcB 73/10) aos antibióticos tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina e polimixina B. Observou-se que todas as estirpes apresentavam resistências a pelo menos dois dos antibióticos estudados, sendo que as estirpes clínicas apresentaram resistências a quase todos os antibióticos. Quanto aos compostos, obteve-se um intervalo de Concentração Mínima Inibitória entre 2 µg/mL e > 32 µg/mL.
- A análise do efeito dos compostos sintéticos derivados do ácido barbitúrico no crescimento de *A. baumannii*, através do traçado da curva de crescimento na presença e ausência de diferentes concentrações de composto ao longo do tempo, permitiu verificar que havia um efeito bacteriostático dos compostos de síntese sobre as células e que as estirpes de isolados clínicos aparentavam ser mais suscetíveis aos compostos do que a estirpe de referência de *A. baumannii* LMG 1025.
- Verificou-se que os compostos de síntese derivados do ácido barbitúrico estudados neste trabalho não se ligaram ou degradaram o ADN bacteriano, sugerindo que não seja o ADN o alvo destes compostos.
- Verificou-se ainda que os compostos em estudo não inibiram o sistema de bombas de efluxo da estirpe de referência de *A. baumannii* LMG 1025, uma vez que se observou que a fluorescência das células com compostos era inferior à observada nas não células tratadas.
- Foi estudado o efeito dos compostos sintéticos derivados do ácido barbitúrico na formação de biofilmes por *A. baumannii*, tendo-se verificado que as diferentes estirpes possuem a capacidade de formação de biofilmes, sendo a estirpe de referência a que apresenta

capacidade mais elevada. Verificou-se que os compostos inibem o processo de formação de biofilmes, mesmo quando aplicados em concentrações subinibitórias. Foi avaliado o efeito dos compostos sintéticos derivados do ácido barbitúrico na inibição do *quorum-sensing* em *Chromobacterium violaceum*, tendo-se verificado que nenhum dos seis compostos utilizados inibe a produção do pigmento violaceína e, conseqüentemente, não inibem o processo de QS.

- No estudo do efeito de concentrações subinibitórias dos compostos de síntese derivados do ácido barbitúrico na motilidade bacteriana, verificou-se que a estirpe de referência de *A. baumannii* LMG 1025 é a que apresenta maior motilidade. Para além disso, observou-se uma redução acentuada de motilidade em culturas de *A. baumannii* da estirpe LMG 1025 quando incubadas em placas contendo os compostos.
- O uso da combinação dos compostos em concentrações subinibitórias e antibióticos contra estirpes de *A. baumannii*, mostrou um efeito na modulação da resistência aos antibióticos em duas estirpes. Na estirpe LMG 1025 o composto JF20 foi capaz de reduzir os valores de CMI para os antibióticos tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina e gentamicina, o composto JF22 para tetraciclina e ciprofloxacina e o composto JF24 tetraciclina, ciprofloxacina e gentamicina. Para a estirpe AcB 13/10 o composto JF20 reduziu as resistências de ciprofloxacina e gentamicina, enquanto o composto JF24 reduziu os valores de Concentração Mínima Inibitória de todos os antibióticos. Não houve modulação da resistência da estirpe AcB 73/10 em nenhum dos antibióticos estudados neste ensaio.
- Foi feita a análise da atividade hemolítica dos seis compostos sintéticos derivados do ácido barbitúrico em estudo em eritrócitos humanos, verificando-se que até 32 µg/mL não havia lise dos eritrócitos humanos.

Desta forma, evidenciou-se o efeito antibacteriano de diversos compostos de síntese derivados do ácido barbitúrico contra *A. baumannii*, o que poderá possibilitar o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com base nestes compostos.

Contudo será importante em estudos futuros o procurar entender o mecanismo de ação dos compostos derivados de ácido barbitúrico, assim como a avaliação *in vivo* da eficácia dos compostos no combate a infecções causadas por este microrganismo. Para além disso, poderá ainda comprovar-se que os compostos aqui em estudo não se ligam ao ADN bacteriano através de outras metodologias, determinar a frequência de mutação de resistências e estudar mecanismos para retardar o desenvolvimento de resistências aos compostos por parte de *A. baumannii*.

Capítulo 8 - Referências Bibliográficas

Askoura, M., Mottawea, W., Abujamel, T. and Taher, I. (2011) 'Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*', *Libyan Journal of Medicine*, 6(1), pp. 1-8. doi: 10.3402/ljm.v6i0.5870.

Azevedo, S. M. M. (2014) *Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos, Universidade Fernando Pessoa e Faculdade de Ciência da Saúde*.

Bhargava, N., Sharma, P. and Capalash, N. (2010) 'Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen.', *Critical reviews in microbiology*, 36(4), pp. 349-360. doi: 10.3109/1040841X.2010.512269.

Castillo-Juárez, I., Maeda, T., Mandujano-Tinoco, E. A., Tomás, M., Pérez-Eretza, B., García-Contreras, S. J., Wood, T. and García-Contreras, R. (2015) 'Role of quorum sensing in bacterial infections.', *World journal of clinical cases*, 3(7), pp. 575-98. doi: 10.12998/wjcc.v3.i7.575.

Cavaleiro, E. *et al.* (2015) 'Novel linear polymers able to inhibit bacterial quorum sensing', *Macromolecular Bioscience*, 15(5), pp. 647-656. doi: 10.1002/mabi.201400447.

Choi, C. H., Cavaleiro, E., Duarte, A. S., Esteves, A. C., Correia, A., Whitcombe, M. J., Piletska, E. V., Piletsky, S. A. and Chianella, I. (2005) 'Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells', *Cellular Microbiology*, 7(8), pp. 1127-1138. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x.

Choi, C. H. *et al.* Choi, C. H., Hyun, S. H., Lee, J. Y., Lee, J. S., Lee, Y. S., Kim, S. A., Chae, J. P., Yoo, S. M. and Lee, J. C. (2008) '*Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity', *Cellular Microbiology*, 10(2), pp. 309-319. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01041.x.

Chusri, S., Chusri, S., Villanueva, I., Voravuthikunchai, S. P. and Davies, J. (2009) 'Enhancing antibiotic activity: A strategy to control *Acinetobacter* infections', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6), pp. 1203-1211. doi: 10.1093/jac/dkp381.

Dhorajiya, B. D., Dhorajiya, B. D., Dholakiya, B. Z., Ibrahim, A. S. and Badria, F. A. (2014) 'Nucleobase-based barbiturates: Their protective effect against DNA damage induced by bleomycin-iron, antioxidant, and lymphocyte transformation assay', *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation, 2014. doi: 10.1155/2014/898670.

Dijkshoorn, L., Nemec, A. and Seifert, H. (2007) 'An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*', *Nature Reviews Microbiol*, 5(12), pp. 939-951. doi: 10.1038/nrmicro2511

10.1038/nrmicro1789.

Duarte, A., Ferreira, S., Silva, F. and Domingues, F. C. (2012) 'Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*', *Phytomedicine*. Elsevier GmbH., 19(3-4), pp. 236-238. doi: 10.1016/j.phymed.2011.11.010.

Duarte, A., Luís, Â., (2016) 'Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp.', *Food Control*, 61, pp. 115-122. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.09.033.

Duarte, A., Ferreira, S., Almeida, S. and Domingues, F. C. (2016) 'Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Portuguese hospital: PFGE characterization, antibiotic susceptibility and biofilm-forming ability', *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Elsevier Ltd, 45, pp. 29-33. doi: 10.1016/j.cimid.2016.02.002.

Duarte, A. F., Ferreira, S., Oliveira, R. and Domingues, F. C. (2013) 'Effect of Coriander Oil (*Coriandrum sativum*) on Planktonic and Biofilm Cells of *Acinetobacter baumannii*', *International Journal of Food Microbiology*, 8(3-4), pp. 62-68. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.004.

Dzidic, S., Suskovic, J. and Kos, B. (2008) 'Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects', *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), pp. 11-21.

Fernandes, R., Amador, P. and Prudêncio, C. (2013) 'β-Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance', *Reviews in Medical Microbiology*, 24(1), pp. 7-17. doi: 10.1097/MRM.0b013e3283587727.

Fleming, A. (2001) 'On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929.', *Bulletin of the World Health Organization*, 79(8), pp. 780-790. doi: 10.1038/146837a0.

Gaidhane, P. K., Dutta, S S., Naha, P P. and Sengupta, M S. (2016) 'Synthesis of Novel Galactopyranosyl - Derived Spiro Barbiturates Synthesis of Novel Galactopyranosyl-Derived Spiro Barbiturates', *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 8303(July). doi: 10.1080/07328300601039328.

Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I. and Ursing, J. (1991) 'Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species', *Journal of Clinical Microbiology*, 29(2), pp. 277-282.

Ghosh, C. *et al.* (2016) 'Designing Simple Lipidated Lysines: Bifurcation Imparts Selective Antibacterial Activity', *ChemMedChem*, 11(21), pp. 2367-2371. doi: 10.1002/cmdc.201600400.

Giamarellou, H., Antoniadou, A. and Kanellakopoulou, K. (2008) 'Acinetobacter baumannii: a universal threat to public health?', *International Journal of Antimicrobial Agents*, pp. 106-119. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.02.013.

Gibbons, S. (2008) 'Phytochemicals for bacterial resistance - Strengths, weaknesses and opportunities', *Planta Medica*, 74(6), pp. 594-602. doi: 10.1055/s-2008-1074518.

Greenberg, K. A. E. and E. P. (2001) 'Quorum Sensing in *Vibrio fischeri*: Analysis of the LuxR DNA Binding Region by Alanine-Scanning Mutagenesis', *Journal of Bacteriology*, 183(1), pp. 382-386. doi: 10.1128/JB.183.1.382.

Greig, S. L. and Scott, L. J. (2016) 'Intravenous Minocycline: A Review in *Acinetobacter* Infections', *Drugs*. Springer International Publishing, 76(15), pp. 1467-1476. doi: 10.1007/s40265-016-0636-6.

Henriksen, S. D. (1973) 'Moraxella, *Acinetobacter*, and the Mimeae.', *Bacteriological reviews*, 37(4), pp. 522-61.

Jadhav, S., Shah, R., Bhav, M. and Palombo, E. A. (2013) 'Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms', *Food Control*. Elsevier Ltd, 29(1), pp. 125-130. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.05.071.

Jeong, Y. C. and Moloney, M. G. (2015) 'Antibacterial barbituric acid analogues inspired from natural 3-acyltetramic acids; Synthesis, tautomerism and structure and physicochemical property-antibacterial activity relationships', *Molecules*, 20(3), pp. 3582-3627. doi: 10.3390/molecules20033582.

Joly-Guillou, M. L. (2005) 'Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*', *Clinical Microbiology and Infection*. European Society of Clinical Infectious Diseases, 11(11), pp. 868-873. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01227.x.

Juni, E. (1978) 'Genetics and Physiology of *Acinetobacter*', *Annual Review of Microbiology*, 32(1), pp. 349-371. doi: doi:10.1146/annurev.mi.32.100178.002025.

Kang, J., Han, J., Gao, Y., Gao, T., Lan, S., Xiao, L., Zhang, Y., Gao, G., Chokto, H. and Dong, A. (2015) 'Unexpected Enhancement in Antibacterial Activity of N-Halamine Polymers from Spheres to Fibers', *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(31), pp. 17516-17526. doi: 10.1021/acsami.5b05429.

Khan, K. M., Ahmad, A., Irshad, A., Broto, L., Kardono, S., Rahim, F., Haider, S. M., Ahmed, S. and Parveen, S. (2014) '1153 Antibacterial and Antifungal Activities of 5-Arylidene- N , N - Dimethylbarbiturates Derivatives', *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 36(6), pp. 1153-1157.

Koeleman, J. G. M., Bijl, M. W. V. D., Stoof, J., Grauls, C. M. J. E. V. S. and , Paul H M. (2014) 'Antibiotic Resistance Is a Major Risk Factor for Epidemic Behavior of *Acinetobacter baumannii*', *Chicago Journals*, 22(5), pp. 284-288.

- Kumar, R., Arora, J., Prasad, A. K., Islam, N. and Verma, A. K. (2013) 'Synthesis and antimicrobial activity of pyrimidine chalcones', *Medicinal Chemistry Research*, 22(11), pp. 5624-5631. doi: 10.1007/s00044-013-0555-y.
- Kumar, R., Arora, J., Ruhil, S., Phougat, N., Chhillar, A. K. and Prasad, A. K. (2014) 'Synthesis and Antimicrobial Studies of Pyrimidine Pyrazole Heterocycles', *Advances in Chemistry*, 2014, pp. 1-12. doi: 10.1155/2014/329681.
- Kwon, S. O., Gho, Y. K., Lee, J. C. and Kim, S. I. (2009) 'Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate', *FEMS Microbiology Letters*, 297(2), pp. 150-156. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01669.x.
- Lee, C.-R. Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, C. J., Jeong, B. C. and Lee, S. H. (2017a) 'Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(March). doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
- Lee, C.-R. Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, C. J., Jeong, B. C. and Lee, S. H. (2017b) 'Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(March). doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
- Longo, F., Vuotto, C. and Donelli, G. (2014) 'Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*.', *The new microbiologica*, 37(2), pp. 119-27.
- López-Rojas, R., Smani, Y. and Pachón, J. (2013) 'Treating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection by blocking its virulence factors.', *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(3), pp. 231-3. doi: 10.1586/eri.13.11.
- Luke, N. R., Sauberan, S. L., Russo, T. A., Beanan, J. M., Olson, R., Loehfelm, T. W., Cox, A. D., Michael, F. S., Vinogradov, E. V. and Campagnari, A. A. (2010) 'Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis', *Infection and Immunity*, 78(5), pp. 2017-2023. doi: 10.1128/IAI.00016-10.
- Martins, A. F. and Barth, A. L. (2013) 'Multidrug-resistant *acinetobacter* - A challenge for public health.', *Scientia Medica*, 23(51), pp. 56-62.
- McConnell, M. J., Actis, L. and Pachón, J. (2013) '*Acinetobacter baumannii*: Human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models', *FEMS Microbiology Reviews*, pp. 130-155. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x.
- McConnell, M. J. and Pachón, J. (2010) 'Active and passive immunization against *Acinetobacter baumannii* using an inactivated whole cell vaccine', *Vaccine*. Elsevier Ltd, 29(1), pp. 1-5. doi:

10.1016/j.vaccine.2010.10.052.

Miyasaki, Y., Nichols, W. S., Morgan, M. A., Kwan, J. A., V. B. M. M., Kittell, P. E. and Hardy, W. D. (2010) 'Screening of herbal extracts against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*', *Phytotherapy Research*, 24(8), pp. 1202-1206. doi: 10.1002/ptr.3113.

NCCLS (2005) *Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, Norma Aprovada*.

Nowak, P. and Paluchowska, P. (2016a) 'Acinetobacter baumannii: Biology and drug resistance ??? role of carbapenemases', *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 54(2), pp. 61-74. doi: 10.5603/FHC.a2016.0009.

Nowak, P. and Paluchowska, P. (2016b) 'Acinetobacter baumannii: Biology and drug resistance – role of carbapenemases', *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 54(2), pp. 61-74. doi: 10.5603/FHC.a2016.0009.

Ohene-Agyei, T., Mowla, R., Rahman, T. and Venter, H. (2014) 'Phytochemicals increase the antibacterial activity of antibiotics by acting on a drug efflux pump', *MicrobiologyOpen*, 3(6), pp. 885-896. doi: 10.1002/mbo3.212.

Peleg, A. Y., Adams, J. and Paterson, D. L. (2007) 'Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), pp. 2065-2069. doi: 10.1128/AAC.01198-06.

Peleg, A. Y., Seifert, H. and Paterson, D. L. (2008) 'Acinetobacter baumannii: Emergence of a successful pathogen', *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 538-582. doi: 10.1128/CMR.00058-07.

Peleg, A. Y., Seifert, H. and Paterson, D. L. (2008) 'Acinetobacter baumannii: Emergence of a successful pathogen', *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), pp. 538-582. doi: 10.1128/CMR.00058-07.

Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N. and Bonomo, R. A. (2007) 'Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 3471-3484. doi: 10.1128/AAC.01464-06.

Pletz, M. W., Uebele, J., Götz, K., Hagel, S. and Bekeredjian-Ding, I. (2016) 'Vaccines against major ICU pathogens', *Current Opinion in Critical Care*, 22(5), pp. 470-476. doi: 10.1097/MCC.0000000000000338.

Poirel, L. and Nordmann, P. (2006) 'Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology', *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(9), pp. 826-836.

Pourhajibagher, M., Boluki, E., Chiniforush, N., Pourakbari, B., Farshadzadeh, Z., Ghorbanzadeh,

- R., Aziemzadeh, M. and Bahador, A. (2016) 'Modulation of virulence in *Acinetobacter baumannii* cells surviving photodynamic treatment with toluidine blue', *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier B.V., 15, pp. 202-212. doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.07.007.
- Prescott, H. (2002) *Laboratory exercises in microbiology, Laboratory exercises in microbiology*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Ramos, A. N., Sesto Cabral, M. E., Arena, M. E., Arrighi, C. F., Arroyo Aguilar, A. A. and Valdéz, J. C. (2014) 'Compounds from *Lactobacillus plantarum* culture supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic wounds.', *Pharmaceutical Biology*, 53(3), pp. 1-9. doi: 10.3109/13880209.2014.920037.
- Raza, A., Xu, X., Xia, L., Xia, C., Tang, J. and Ouyang, Z. (2016) 'Quercetin-Iron Complex: Synthesis, Characterization, Antioxidant, DNA Binding, DNA Cleavage, and Antibacterial Activity Studies', *Journal of Fluorescence*. *Journal of Fluorescence*, 26(6), pp. 2023-2031. doi: 10.1007/s10895-016-1896-y.
- Rice, L. B. (2006) 'Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*', *Clinical infectious diseases*, 43(Supplement 2), pp. S100-S105. doi: 10.1086/504487.
- Russo, T. A., Beanan, J. M., Olson, R., MacDonald, U., Cox, A. D., St. Michael, F., Vinogradov, E. V., Spellberg, B., Luke-Marshall, N. R. and Campagnari, A. A. (2013) 'The K1 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* is a potential therapeutic target via passive immunization', *Infection and Immunity*, 81(3), pp. 915-922. doi: 10.1128/IAI.01184-12.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S. and Bestervelt, L. L. (2013) 'Microbial siderophores: A mini review', *Journal of Basic Microbiology*, 53(4), pp. 303-317. doi: 10.1002/jobm.201100552.
- Sharma, S., Sharma, V., Singh, G., Kaur, H., Srivastava, S. and Ishar, M. P. S. (2017) '2-(Chromon-3-yl)imidazole Derivatives As Potential Antimicrobial Agents: Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking Studies', *Journal of Chemical Biology*. *Journal of Chemical Biology*, 10(1), pp. 35-44. doi: 10.1007/s12154-016-0162-8.
- Singh, M., Singh, S. K., Gangwar, M., Nath, G. and Singh, S. K. (2016) 'Design, synthesis and mode of action of novel 2-(4-aminophenyl)benzothiazole derivatives bearing semicarbazone and thiosemicarbazone moiety as potent antimicrobial agents', *Medicinal Chemistry Research*. Springer US, 25(2), pp. 263-282. doi: 10.1007/s00044-015-1479-5.
- Sokmen, B. B., Ugras, S., Sarikaya, H. Y., Ugras, H. I. and Yanardag, R. (2013) 'Antibacterial, antiurease, and antioxidant activities of some arylidene barbiturates', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(8), pp. 2030-2039. doi: 10.1007/s12010-013-0486-6.

Srinivasan, V. B., Venkataramaiah, M., Mondal, A. and Rajamohan, G. (2015) 'Functional characterization of AbeD, an RND-type membrane transporter in antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*', *PLoS ONE*, 10(10), pp. 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0141314.

Su, Z., Peng, L., Worthington, R. J. and Melander, C. (2011) 'Evaluation of 4,5-Disubstituted-2-Aminoimidazole-Triazole Conjugates for Antibiofilm/Antibiotic Resensitization Activity Against MRSA and *Acinetobacter baumannii*', *ChemMedChem*, 6(12), pp. 2243-2251. doi: 10.1002/cmdc.201100316.

Tacconelli, E., Magrini, N., Kahlmeter, G. and Singh, N. (2017) 'Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery, And Development Of New Antibiotics', *World Health Organization*, pp. 1-7.

Tängdén, T., Hickman, R A., Forsberg, P., Lagerbäck, P., Giske, C G. and Cars, O. (2014) 'Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 9734(February), pp. 1-5. doi: 10.3109/03009734.2014.899279.

The, J. O. F. (1942) 'Barbituric Acid Derivatives', *Journal of the American Pharmaceutical Association*, (Table I), pp. 128-133.

Towner, K. J. (2009) 'Acinetobacter: an old friend, but a new enemy', *Journal of Hospital Infection*. Elsevier Ltd, 73(4), pp. 355-363. doi: 10.1016/j.jhin.2009.03.032.

Vijayakumar, S., Rajenderan, S., Laishram, S., Anandan, S., Balaji, V. and Biswas, I. (2016) 'Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates', *Frontiers in Public Health*, 4(May), pp. 1-9. doi: 10.3389/fpubh.2016.00105.

Vila, J. and Pachon, J. (2008) 'Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections', *Expert Opinion Pharmacotherapy*, 9(1744-7666 (Electronic)), pp. 587-599. doi: 10.1517/14656566.9.4.587.

Vila, J. and Pachón, J. (2008) 'Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii*', *Expert Opinion Pharmacotherapy*, 9(4), pp. 587-600.

Voukeng, I. K., Beng, V. P. and Kuete, V. (2016) 'Antibacterial activity of six medicinal Cameroonian plants against Gram-positive and Gram-negative multidrug resistant phenotypes', *BMC Complementary and Alternative Medicine*, pp. 1-9. doi: 10.1186/s12906-016-1371-y.

Weber, B. S., Kinsella, R. L., Harding, C. M. and Feldman, M. F. (2017) 'The Secrets of *Acinetobacter* Secretion', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 532-545. doi: 10.1016/j.tim.2017.01.005.

White, K. S., Nicoletti, G. and Borland, R. (2014) 'Nitropropenyl Benzodioxole, An Anti-Infective Agent with Action as a Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor', *The Open Medicinal Chemistry* 66

Journal, 8(1), pp. 1-16. doi: 10.2174/1874104501408010001.

Wieczorek, P., Sacha, P., Hauschild, T., Zórawski, M., Krawczyk, M. and Trynieszewska, E. (2008) 'Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* - The role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics', *Folia Histochemica et Cytobiologica*, pp. 257-267. doi: 10.2478/v10042-008-0056-x.

Woodford, N., Wareham, D. W., Chopra, I., Ellington, M., Enne, V. I., Fairhead, H., Fraser, W., Gait, M. J., Lambert, P. A., Livermore, D. M., Neil, A. J., Schneiders, T., Wareham, D. W. D. W., Woodford, N. and Yakubu, D. E. (2009) 'Tackling antibiotic resistance: A dose of common antisense?', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), pp. 225-229. doi: 10.1093/jac/dkn467.

Yan, Q., Cao, R., Yi, W., Chen, Z., Wen, H., Ma, L. and Song, H. (2009) 'Inhibitory effects of 5-benzylidene barbiturate derivatives on mushroom tyrosinase and their antibacterial activities', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 44(10), pp. 4235-4243. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.05.023.