



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

PATRÍCIA VIRNA SALES LEÃO

**MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS TRADICIONAIS PELA  
RIPARINA B EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii***

TERESINA-PI

2020

PATRÍCIA VIRNA SALES LEÃO

**MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS TRADICIONAIS PELA  
RIPARINA B EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii***

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências e Saúde.

Área de concentração: Métodos diagnósticos e análise das condições de saúde.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Josie Haydée Lima Ferreira Paranaguá.

TERESINA-PI

2020

PATRÍCIA VIRNA SALES LEÃO

**MODULAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS TRADICIONAIS PELA  
RIPARINA B EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii***

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências e Saúde.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Josie Haydée Lima Ferreira Paranaguá  
Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Presidente

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria do Rosário Conceição Moura Nunes  
Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Membro Externo ao Programa

---

Prof. Dr.<sup>o</sup> Humberto Medeiros Barreto  
Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Membro Externo ao Programa

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Girlene Soares de Figueiredo  
Universidade Federal do Piauí – UFPI  
Suplente

**Dedico esse trabalho ao dono da minha essência: DEUS!**

## AGRADECIMENTOS

**Ninguém e nada cresce sozinho. Sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor.**

Início agradecendo à Deus, pelas bênçãos concedidas e por me iluminar nessa caminhada. Sem ti nada disso seria possível.

A minha linda mãe, Graça Leão, com zelo e dedicação de genitora que sempre teve para os filhos.

Aos meus filhos e netos, onde representam parte da minha raiz e felicidade, tentando ser pra eles o exemplo, sempre mostrando a importância do estudo, do amor, da honestidade, da família, confiança, humildade e perseverança.

A Universidade Federal do Piauí – Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Parasitologia e Microbiologia pelo Programa de Pós Graduação em Ciências e Saúde, pela oportunidade de cursar o mestrado e pela excelência no ensino e na pesquisa.

A minha orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Josie Haydée Lima Ferreira Paranaguá que brilhantemente nos ensina que podemos mais do que temos consciência de que somos capazes.

Ao meu co-orientador: Prof. Dr.<sup>o</sup> Humberto Medeiros Barreto que se fez presente sempre com muita presteza.

Ao Prof. Dr.<sup>o</sup> Francisco Cardoso Figueiredo da Universidade Federal do Piauí - UFPI, pelo convívio e pelo incrível apoio e ajuda nos momentos mais críticos e por acreditar em mim, mesmo quando tudo estava dando errado.

Ao Prof. Dr.<sup>o</sup> Adalberto Socorro da Silva, sub-coordenador do Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí (LIB-UFPI) pela simpatia e colaboração na bioinformática.

Ao Laboratório de Doenças Infecto Contagiosas (LASAN), onde parte do trabalho foi realizado sob orientação e presteza do Ms. Felipe Araújo de Alcântara Oliveira.

À Avilnete Belém de Souza Mesquita, que tive a oportunidade de conhecer, por estar sempre preparada para ajudar e ensinar algo, sempre prestativa e com boa vontade.

À Ana Laura Ferreira, que acompanha desde o início da minha jornada e sempre me prestou o seu carinho e auxílio.

Tenham certeza que vocês são os responsáveis pela pessoa que eu sou. Muito obrigada por todo o apoio, essa conquista também pertence a vocês!!!

A todas as pessoas que participaram diretamente ou indiretamente do meu trabalho,

**MUITO OBRIGADA!**

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

**(Martin Luther King)**

## RESUMO

Bactérias multirresistentes são responsáveis por elevados coeficientes de morbimortalidades em países de todo o mundo, exigindo o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento. O *Acinetobacter baumannii* é um importante patógeno oportunista causador de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), severas, especialmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Dentre as espécies medicinais estudadas, o gênero *Aniba riparia* (Nees) Mez, a partir do seu fruto verde, foram isolados alguns alcalóides, do tipo alcalidas, que foram chamados de Riparinas. Em adição a ocorrência natural dessas moléculas, Gutierrez e colaboradores (2005), usando a reação de Schotten-Bauman, obtiveram análogos sintéticos chamados de Riparinas A, B, C, D, E, F, onde algumas delas apresentam atividades biológicas, associadas a sua ação em nível de sistema nervoso central (SNC), tais como efeitos ansiolítico e antidepressivo e também atividade antiinflamatória e anti-nociceptiva. O presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade antimicrobiana da Riparina B (Rip - B) isoladamente e em associação com antibióticos tradicionais contra cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes de origem clínicas. Para tanto, as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas pelo método de microdiluição. Para a avaliação da atividade moduladora da resistência, a CIM dos antimicrobianos foi determinada na presença e na ausência de uma concentração subinibitória de Rip - B (Produto Teste), Clorpromazina (CPZ) inibidor conhecido de bomba de efluxo e o Brometo de Etídio (EtBr) substrato de bomba de efluxo bacterianos. Os resultados mostraram que a Rip - B apresenta fraca atividade antibacteriana intrínseca contra as cepas testadas. Por outro lado, quando a Rip - B foi associada aos antibióticos e em concentrações subinibitórias, provocou redução nos valores de CIM dos antibióticos Norfloxacina, Amicacina e Ceftazidima contra cepas de *A. baumannii* expressando fenótipo de resistência mediado por bombas de efluxo. Tal efeito modulador não foi evidenciado nas cepas que, embora resistentes, não expressavam fenótipo de resistência mediada por bombas de efluxo. Estes resultados indicam que Rip-B é uma molécula promissora como um agente capaz de potencializar a ação de diferentes antibióticos, tais como Norfloxacina, Amicacina e Ceftazidima, podendo ser utilizadas em associação com estes antibióticos no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* multirresistentes que expressam fenótipo de resistência mediado por bomba de efluxo.

**Palavras – chave:** *Acinetobacter baumannii*. Riparina B, Atividade Antimicrobiana. Resistência a Antibióticos. Inibidores de Bomba de Efluxo.

## ABSTRACT

Multidrug-resistant bacteria are responsible for high coefficients of morbidity and mortality in countries around the world, requiring the development of new prevention and treatment strategies. *Acinetobacter baumannii* is an important opportunistic pathogen that causes severe healthcare-related infections (HAIs), especially in intensive care units (ICU). Among the medicinal species studied, the genus *Aniba riparia* (Nees) Mez, from its green fruit, some alkaloids, of the type alcamides, were called, which were called Riparinas. In addition to the natural occurrence of these molecules, Gutierrez and collaborators (2005), using the Schotten-Bauman reaction, obtained synthetic analogs called Riparinas A, B, C, D, E,F, where some of them present biological activities, associated with their action on the central nervous system (CNS) level, such as anxiolytic and antidepressant effects and also antiinflammatory and antinociceptive activity. The present study aimed to investigate the antimicrobial activity of Riparina B (Rip - B) alone and in association with antibiotics traditional against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii* of clinical origin. Therefore, the minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by the microdilution method. For the evaluation of resistance modulating activity, the MIC of the antimicrobials was determined in the presence and in the absence of a subinhibitory concentration of Rip - B (Test Product), Chlorpromazine (CPZ) known efflux pump inhibitor and Ethidium Bromide (EtBr ) bacterial efflux pump substrate. The results showed that Rip - B has weak intrinsic antibacterial activity against the strains tested. On the other hand, when Rip - B was associated with antibiotics and in subinhibitory concentrations, it caused a reduction in the MIC values of the antibiotics Norfloxacin, Amikacin and Ceftazidime against *A. baumannii* strains expressing resistance phenotype mediated by efflux pumps. Such a modulating effect was not evidenced in strains that, although resistant, did not express a phenotype of resistance mediated by efflux pumps. These results indicate that Rip-B is a promising molecule as an agent capable of potentiating the action of different antibiotics, such as Norfloxacin, Amikacin and Ceftazidime, and can be used in combination with these antibiotics to treat infections caused by multidrug-resistant *A. baumannii* that express resistance phenotype mediated by efflux pump.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*. Riparina B. Antimicrobial Activity. Resistance to Antibiotics. Efflux Pump Inhibitors.

## Lista de Tabelas e Gráficos

**Tabela 1.** Origem e características fenóticas de resistência dos isolados de *Acinetobacter baumannii* utilizados nesse estudo com Amicacina.

**Tabela 2.** Origem e características fenóticas de resistência dos isolados de *Acinetobacter baumannii* utilizados nesse estudo com Ceftazidima.

**Tabela 3.** Origem e características fenóticas de resistência dos isolados de *Acinetobacter baumannii* utilizados nesse estudo com Norfloxacin.

**Tabela 4.** Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Riparina B (Rip-B) contra isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes à Amicacina.

**Tabela 5.** Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Riparina B (Rip-B) contra isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes à Ceftazidima.

**Tabela 6.** Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Riparina B (Rip-B) contra isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes à Norfloxacin.

**Gráfico 1.** CIM da Amicacina (AMI) na ausência ou presença de Riparina B (Rip-B), Clorpromazina (CPZ) ou Brometo de Etídio (BrEt) na concentração sub-inibitória para *Acinetobacter baumannii* multirresistente.

**Gráfico 2.** CIM da Ceftazidima (CEF) na ausência ou presença de Riparina B (Rip-B), Clorpromazina (CPZ) ou Brometo de Etídio (BrEt) na concentração sub-inibitória para *Acinetobacter baumannii* multirresistente.

**Gráfico 3.** CIM da Norfloxacin (NOR) na ausência ou presença de Riparina B (Rip-B), Clorpromazina (CPZ) ou Brometo de Etídio (BrEt) na concentração sub-inibitória para *Acinetobacter baumannii* multirresistente.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação esquemática dos principais tipos de sistemas de efluxo bacteriano.

**Figura 2.** Exsicata *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae).

**Figura 3.** Riparinas isoladas de *Aniba riparia* (Nees) Mez. Riparina I (*N*-benzoiltiramina), Riparina II (*N*-(2-hidroxibenzoil) -tiramina) e Riparina III (*N*-(2,6-dihidroxibenzoil) -tiramina).

**Figura 4.** Estrutura química da Riparina-B (*N*-[2-(3,4-dimetoxi-fenil) etil] -benzamida).

**Figura 5.** Modulação da resistência aos antibióticos industrializados.

## ABREVIATURAS E SIGLAS

*A. baumannii* - *Acinetobacter baumannii*

AMC - Ágar McConkey

AMI - Amicacina

AN - Ágar Nutriente

ANOVA - Análise de Variância

BE - Bomba de Efluxo

BrEt - Brometo de Etídio

BHI - Brain Heart Infusion

CAAE - Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CCCP - Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CEF - Ceftazidima

CEFE - Cefepeme

CEFT - Ceftriaxona

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CIM - Concentração inibitória mínima

CIPRO - Ciprofloxacina

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

CPZ - Clorpromazina

DPM - Departamento de Parasitologia e Microbiologia

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade Ótica

OXA - Oxacilina

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético

EMAs - Enzima Modificadora de Aminoglicosídeos

ESBL -  $\beta$ -Lactamase de Espectro Estendido

FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

GEN - Gentamicina

HUT - Hospital de Urgência de Teresina  
IM - Membrana Interna  
IMI - Imipenem  
IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à saúde  
LB - Luria Bertani  
LEVO - Levofloxacina  
LOS - Lipoligossacarídeos  
MATE - Multiplasdrogas e Extrusão de Compostos Tóxicos  
MBLs - Metallo- $\beta$ -lactamases  
MDR - Resistente a Multiplasdrogas  
MERO - Meropenem  
MFP - Proteína de Fusão de Membrana  
Min - Minuto  
NOR - Norfloxacina  
OM - Membrana externa  
OMF - Fator de Membrana Externa  
OXA - Oxacilinase  
PAP - Proteína Adaptadora Periplasmática  
pb - Pares de base  
pH - Potencial hidrogeniônico  
PBP<sub>s</sub> - Penicillin-binding proteins  
PCR - Polimerase Chain Reaction  
PMF - Força próton motiva  
PIPE/TAZO - Piperaciclina/Tazocin  
rDNA - Ácido desoxirribonucleico ribossomal  
Rip B - Riparina B  
RT-qPCR - Reverse Transcription qPCR  
RNA - Ácido ribonucleico  
RNAm - Ácido ribonucléico mensageiro  
RNase - Ribonuclease  
RND - Divisão de Resistência a Nodulação  
S - Sensível  
SMS - Pequena Resistência Multiplasdrogas  
TBE - Solução tampão de Tris/Borato/EDTA

TIGE - Tigeciclina

TRIME/SULFA - Trimetropim/sulfametoxazol

TSA - Ágar Triptona de Soja

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UFPI - Universidade Federal do Piauí

UTI - Unidade de terapia intensiva

XDR - Extensivamente Resistente a Droga

## LISTA DE SIMBOLOS

$\beta$  - Beta

$^{\circ}\text{C}$  – Grau Celsius (Medida de Temperatura)

g - Gramas

Kg - Quilograma

M - mol

mg - Miligrama

$\text{MgCl}_2$  - Cloreto de magnésio

mL - Mililitro

mM - MilliMolar

nM - Nanometro

$\text{Na}^+$  - Sódio

$\text{NaCl}$  - Cloreto de sódio

$\mu\text{g}$  - Micrograma

$\mu\text{L}$  - Microlitro

$\mu\text{M}$  - Micromolar

m/v - Massa/Volume

% - Porcentagem

> Maior que

< Menor que

q.s.p – Quantidade suficiente para

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>20</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Gênero Acinetobacter spp. ....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Acinetobacter baumannii .....</b>	<b>22</b>
3.2.1 Fatores de Virulência de <i>A. baumannii</i> .....	23
<b>3.3 Resistência aos Antimicrobianos em <i>A. baumannii</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>3.4 Sistema de Efluxo em <i>A. baumannii</i>.....</b>	<b>28</b>
I) Família “ATP-binding cassette” (ABC) .....	29
II) “Major facilitator superfamily” (MFS).....	31
III) Família “Resistance nodulation cell division” (RND) .....	31
IV) Família “Multidrug and toxic compound extrusion” (MATE) .....	32
V) Família “Small multidrug resistance” (SMR) .....	32
<b>3.5 Tratamento de Infecções por <i>A. baumannii</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>3.6 Família Lauraceae .....</b>	<b>33</b>
<b>3.7 Aniba riparia e as Riparinas.....</b>	<b>35</b>
<b>3.8 Análogos Sintéticos .....</b>	<b>37</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Linhagens bacterianas.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Reagentes.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Avaliação da atividade antibacteriana .....</b>	<b>39</b>
<b>4.4 Ensaios de modulação da resistência a antibióticos de uso tradicional.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6 Análise Estatística.....</b>	<b>41</b>

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1 Amicacina .....</b>	<b>47</b>
<b>5.2 Cefotaxima .....</b>	<b>50</b>
<b>5.3 Norfloxacinã .....</b>	<b>52</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Infecções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos representam um problema de saúde pública da atualidade, uma vez que elas têm provocado um aumento nas taxas de morbimortalidade na população (STROMMENDER *et al.*, 2014; LÓPEZ-CAMACHO *et al.*, 2014). Dados preliminares da Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde mostraram que, *Acinetobacter* spp. é o grupo mais crítico de todos que inclui bactérias multirresistentes, que são particularmente perigosas em hospitais, casas de repouso e entre os pacientes cujos cuidados exigem dispositivos como ventiladores e cateteres intravenosos (ANVISA, 2015).

As bactérias do gênero *Acinetobacter* (família Moraxellaceae, ordem Gammaproteobacteria), são caracterizados como cocobacilos, gram-negativos, imóveis, catalase-positivos, oxidase-negativos e não fermentadores (VIEIRA; PICOLI, 2015). Este gênero compreende 26 espécies nomeadas e nove espécies genômicas, sendo que quatro espécies de *Acinetobacter* (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*) são referidas como complexo *A. baumannii-calcoaceticus* por apresentarem características fenotípicas análogas. Dentre as espécies citadas, *Acinetobacter baumannii* é a mais prevalente clinicamente.

*A. baumannii* é classificada como um patógeno oportunista comumente associado a surtos de infecções relacionadas a assistência a saúde (IRAS), ocorridas principalmente em UTI (MARTINS; BARTH, 2013). Este patógeno é agente causador de várias infecções, incluindo pneumonia, septicemia, meningite, infecção do trato urinário, de feridas cirúrgicas e queimaduras, geralmente associada à terapia antibiótica prévia e imunossupressão (FIGUEREDO *et al.*, 2009). A sua significância clínica é justificada por sua alta prevalência em epidemias e situações endêmicas com notável capacidade de adquirir resistência aos antibióticos, à dessecação e sua capacidade de formar biofilmes em dispositivos médicos, contribuindo para a sua persistência no cenário hospitalar (ROBERTS *et al.*, 2001; PELEG *et al.*, 2008; DE BREIJ *et al.*, 2010).

Linhagens de *A. baumannii* isoladas do ambiente hospitalar frequentemente apresentam resistência a múltiplas drogas, podendo apresentar diferentes mecanismos de resistência contra praticamente todos os antimicrobianos comercialmente disponíveis para o seu tratamento (ZAVASCKI *et al.*, 2010). A resistência aos antibióticos em *A. baumannii* pode ser conferida por diferentes mecanismos, intrínsecas ou adquiridas, os quais podem ser a superprodução de

bombas de efluxo, redução da permeabilidade da membrana externa, alteração do sítio alvo e produção de betalactamases. (LEE *et al.*, 2017).

Os medicamentos à base de plantas, vêm ganhando cada vez mais espaço, assumindo um papel importante na busca por alternativas terapêuticas para microrganismos resistentes (ZAFALON *et al.*, 2007; WERKMAN *et al.*, 2008). Agnihotri *et al.* (2010), reportaram que, com o surgimento da medicina moderna, houve necessidade de investigar os constituintes ativos presentes nas plantas e que diversas moléculas já foram identificadas, isoladas e testadas no que concerne à sua ação farmacológica. Ainda nessa linha de estudo observaram que as moléculas ativas presentes nas plantas forneceram as ferramentas necessárias para o desenvolvimento de moléculas sintéticas mais eficazes.

Dentre as espécies medicinais estudadas, merecem destaque as pertencentes ao gênero *Aniba*, pertencente à família Lauraceae (SOUSA *et al.*, 2004). Algumas dessas espécies apresentam atividades biológicas, associadas a sua ação em nível de sistema nervoso central (SNC), tais como efeitos ansiolítico e antidepressivo (MELO *et al.*, 2006; CARVALHO, 2011), e também atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (DIAS, 2012; OLIVEIRA, 2012).

A partir do fruto verde de *Aniba riparia* (Nees) Mez, foram isolados alguns alcalóides, do tipo alcalmidas, que foram chamados de Riparinas. Foram identificadas as riparinas I, II e III naturalmente isoladas de *A. riparia*. Em adição a ocorrência natural dessas moléculas, Gutierrez e colaboradores (2005), usando a reação de Schotten-Bauman, obtiveram análogos sintéticos chamados de Riparinas A, B, C, D, E e F. Esses análogos sintéticos (riparinas) foram obtidos utilizando uma metodologia simples com resultados seguros e viabilização de exploração comercial dessas novas moléculas pela indústria farmacêutica, diante da disponibilidade independente da concentração da substância selecionada nas fontes naturais (GUTIERREZ, 2007).

A Riparina B é um análogo sintético, alcaloide do ciclo não-heterocíclico. É formada da união da tiramina, uma feniletilamina e o ácido benzoico. Apresenta uma substituição no anel do ácido benzoico, acrescentando uma hidroxila e o anel da tiramina apresenta um metil ligado ao oxigênio formando uma função éter (NUNES *et al.*, 2014). Essa alcalmida é capaz de induzir, de forma não-específica e reversível, o relaxamento das contrações produzidas por acetilcolina e histamina em fêto de cobaia e por ocitocina e bradicinina em útero de rata virgem, com valores de CI<sub>50</sub> variando de 1,7 a 5 µg/mL (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000).

Um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa evidenciou que a Riparina B foi capaz de potencializar a atividade dos antibióticos Norfloxacin e Ciprofloxacina através da inibição da bomba de efluxo NorA de *Staphylococcus aureus* (COSTA *et al.*, 2016). Este resultado nos motivou a investigar se a Riparina B também seria capaz de modular a resistência de isolados clínicos de *A. baumannii* expressando fenótipo de resistência mediado por bomba de efluxo.

Baseado na relevância clínica e epidemiológica da espécie *A. baumannii* como agente etiológico de IRAS nos hospitais brasileiros, este estudo teve como objetivo investigar a atividade antibacteriana intrínseca da Riparina B e sua capacidade moduladora da resistência a antimicrobianos tradicionais contra isolados clínicos de *A. baumannii*, isolados de pacientes do Hospital de Urgência de Teresina (HUT-PI), com fenótipo de resistência por bomba de efluxo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antibacteriana intrínseca da Riparina B e sua ação moduladora da resistência aos antimicrobianos em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, multirresistentes, expressando fenótipo de resistência mediada por bomba de efluxo.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana intrínseca da Riparina B contra diferentes estirpes de *A. baumannii* multirresistente através da técnica de microdiluição;
- Identificar o tipo de atividade antibacteriana (bactericida ou bacteriostática) através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Riparina B;
- Avaliar o efeito da Riparina B como agente modulador da resistência à antibióticos de diferentes classes em linhagens de *A. baumannii* expressando fenótipo de resistência mediada por bomba de efluxo;
- Verificar se o possível efeito modulador da resistência aos antibióticos exibidos pela Riparina B, nas linhagens de *A. baumannii*, está relacionado com a inibição de bombas de efluxo, através de ensaios de modulação com Brometo de Etídio.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Gênero *Acinetobacter* spp.

As espécies bacterianas classificadas como membros do gênero *Acinetobacter* tem um longo histórico de variação taxonômica. Por muito tempo, esse gênero foi considerado como um representante da família Neisseriaceae, porém, atualmente é membro da família Moraxellaceae (ordem das Pseudomonadales, classe das Gammaproteobacteria, filo Proteobacteria e reino Bacteria) (EUZÉBY, 2014a).

De acordo com Peleg e colaboradores (2008), esse gênero surgiu no século XX, em 1911, descrita pelo Beijerinck, microbiologista dinamarquês, após um experimento com enriquecimento do solo com um meio contendo acetato de cálcio ao qual chamou *Micrococcus calcoaceticus*. O gênero *Acinetobacter* vem do grego akivetoo (akinetos), que significa imóvel, proposta essa dada inicialmente por Brisou e Pévot, em 1954, que permitia a diferenciação dos microorganismos móveis dentro do gênero *Achromobacter* (TORRES *et al.*, 2010). Anos depois, esse mesmo cientista descreveu organismos semelhantes que foram atribuídos há pelo menos 15 gêneros e espécies diferentes, entre elas: *Diplococcus mucosus*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Alcaligenes*, *Haemolysans*, *Mima polymorpha*, *Moraxella Iwoffi*, *Bacteria anitratum*, *Moraxella Iwoffivar*, *Achromobacter anitratum* entre outras (TORRES *et al.*, 2010)

O gênero *Acinetobacter* é altamente diversificado, composto por coccobacilos, Gram-negativos, oxidase-positivo, catalase-negativo e não pigmentados. Atualmente, o gênero apresenta mais de 50 espécies (ATROUNI *et al.*, 2016). Em geral, *Acinetobacter* spp. são encontradas em ambientes úmidos, incluindo solo úmido/lama, áreas úmidas, lagoas, estações de tratamento de água, pisciculturas, águas residuais e até água do mar (ATROUNI *et al.*, 2016). Essas cepas ambientais, geralmente, abrigam mecanismos de resistência a antibióticos, incluindo carbapenemas e  $\beta$ -lactamasas de amplo espectro (*Extended spectrum beta-lactamases* - ESBLs) (ATROUNI *et al.*, 2016).

Segunda a ANVISA (2016), nos hospitais brasileiros, o gênero *Acinetobacter* se encontra entre os patógenos mais notificados, acometendo pacientes hospitalizados em UTI's e com uma frequência de isolamento de 12,6%. Entre as regiões geográficas do Brasil, o Nordeste apresenta a segunda maior frequência de isolamento de *Acinetobacter* spp., nestes pacientes, correspondendo a 13%, ficando atrás somente da região sudeste com cerca de 15%.

Espécies do gênero *Acinetobacter* tem maior capacidade de sobrevivência na região das pontas dos dedos e em superfícies secas quando testadas em condições ambientais similares ao ambiente hospitalar. Adicionalmente, a contaminação da pele de pacientes e profissionais de saúde pode estar relacionada a transmissão dos isolados e surtos (JAWAD *et al.*, 1998; HARDING *et al.*, 2013).

Equipamentos reutilizáveis, tais como: tubo de ventilação, respirômetro e dispositivo para monitoramento da pressão arterial utilizados em pacientes graves, além de objetos como colchões, travesseiros, TV e ventiladores, se apresentam como uma rota de transmissão para os pacientes, pois estes equipamentos podem servir de reservatório durante surtos de infecções relacionadas a IRAS, em razão da capacidade desses patógenos de resistir à dessecação (JAWAD *et al.*, 1998; HARDING *et al.*, 2013).

De um modo geral, os membros do gênero *Acinetobacter* spp. são considerados ubíquos, no entanto, as espécies de importância clínica, incluindo *A. baumannii* não possuem habitat natural conhecido fora do hospital, sendo isolados em pacientes e em ambientes hospitalares durante surtos (JOLY-GUILLOU, 2005; TOWNER, 2009; HARDING *et al.*, 2013).

*Acinetobacter baumannii* é a espécie mais relevante do gênero associado a infecções oportunistas em humanos (LIN *et al.*, 2014). Análises multivariadas de dados clínicos e estudos de modelos animais demonstraram que *A. baumannii* é a mais virulenta de todas as espécies do gênero (CHUSRI *et al.*, 2014).

### **3.2 *Acinetobacter baumannii***

O complexo *A. baumannii*, morfológicamente, pertence a um grupo heterogêneo de cocobacilos com 0.9-1.6 µm de diâmetro, Gram-negativos e são fenotipicamente não fermentadores de carboidratos, estritamente aeróbios, imóveis, oxidase negativa e catalase positiva (MONTEFOUR, 2008). Caracterizadas como bactérias não fastidiosas e de crescimento rápido em meios utilizados na rotina laboratorial como o ágar nutriente (AN), ágar tripton de soja (TSA) e ágar sangue (ALMASAUDI, 2016).

A espécie *A. baumannii* é classificada como um patógeno oportunista comumente associado a surtos hospitalares devido a sua alta incidência em pacientes com quadros clínicos graves em UTIs. Está envolvido numa variedade de IRAS, incluindo sistemas de órgãos que contêm altos níveis de fluidos, como o sistema respiratório, circulatório, urinário e a cavidade

peritoneal (ALMASAUDI, 2016). No entanto, as infecções causadas por esse patógeno associadas à altas taxas de morbidade e mortalidade, são aquelas que atingem a corrente sanguínea e o trato respiratório (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). A ocorrência de infecções pela corrente sanguínea por *A. baumannii* é relacionada ao uso de cateteres respiratórios e intravasculares, que permite o acesso da bactéria ao sangue (ALMASAUDI, 2016). No entanto, seu papel predominante é como agente causador de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) em pacientes internados em UTI (BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996; MA et al., 2015; SAFARI et al., 2015). Esse fato lhe conferiu o topo de uma lista publicada pela Organização Mundial da Saúde com relação às espécies bacterianas consideradas “críticas”, as quais necessitam de novos estudos para o desenvolvimento de novos antibióticos e alternativas terapêuticas (WHO, 2017).

*A. baumannii* possui a habilidade de aderir, colonizar e invadir células epiteliais humanas, inclusive em indivíduos saudáveis. Além disso, adquirem por transferência horizontal uma grande diversidade de genes de resistência a antimicrobianos e de virulência, que lhes conferem a capacidade de resistir ao tratamento, e de formação de biofilmes e resistência à dessecação (BROSSARD; CAMPAGNARI, 2012; LEE *et al.*, 2008; ZARRILLI *et al.*, 2013).

Para o tratamento de infecções causadas por *A. Baumannii*, estudos indicam que vem sendo gradualmente reduzido a um número limitado de antimicrobianos, devido a sua habilidade de adquirir inúmeros mecanismos de resistência pelo aumento de cepas multirresistentes em todas as regiões do mundo (GALES *et al.*, 2018). O aumento da pressão seletiva, principalmente devido ao uso indiscriminado de antibióticos, explica o surgimento de cepas *A. baumannii* resistentes aos principais agentes antimicrobianos utilizados na terapia de doenças infecciosas como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e  $\beta$ -lactâmicos (SOHAIL *et al.*, 2016).

### 3.2.1 Fatores de Virulência de *A. baumannii*

A virulência é o grau de patogenicidade dentro de um grupo ou espécies de organismos, não sendo atribuída a um só fator, mas a vários parâmetros relacionados ao microrganismo, ao hospedeiro e à interação entre ambos (KONEMAN, 2012). Recentemente, a realização de análises genômicas e fenotípicas permitiu caracterizar um conjunto de fatores de virulência predominantes em *A. baumannii*, responsáveis pela sua patogenicidade no hospedeiro (Évora, 2019). Estes incluem a presença de porinas de membrana externa, presença de

lipopolissacarídeo (LPS), produção de fosfolipases e proteases, formação de biofilmes, produção da cápsula polissacarídea e o sistemas quelantes de ferro (LEE *et al.*, 2017).

Porinas são proteínas da membrana externa associadas à modulação da permeabilidade celular. OmpA é uma porina  $\beta$ -barril e uma das porinas mais abundantes na membrana externa. Em *A. baumannii*, OmpA é o fator de virulência muito bem caracterizado com uma variedade de propriedades biológicas interessantes identificadas em estudos “in vitro” (SMITH *et al.*, 2007; MCCONNELL *et al.*, 2013). A OmpA purificada é capaz de se ligar aas células epiteliais do hospedeiro, atinge as mitocôndrias e induz apoptose, liberando moléculas pró-apoptóticas, como citocromo C e fator de indução de apoptose (CHOI *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2010). Outro estudo mostrou que OmpA se transloca para o núcleo por um novo sinal de localização nuclear monopartida e induz a morte celular (CHOI *et al.*, 2008a). OmpA também desempenha um papel importante na adesão e invasão de células epiteliais por interação com fibronectina (CHOI *et al.*, 2008b; GADDY *et al.*, 2009; SMANI *et al.*, 2012) e se liga ao fator H no soro humano (KIM *et al.*, 2009), que pode permitir que *A. baumannii* evite a morte mediada por complemento. A proteína Omp de 33 a 36 kDa (Omp33-36), que atua como um canal de passagem de água, é outra porina da membrana externa associado à citotoxicidade de *A. baumannii* (SMANI *et al.*, 2013; RUMBO *et al.*, 2014).

Além de OmpA, o envelope de *A. baumannii* está associado com muitos fatores que contribuem para a patogenicidade. Entre estes, exopolissacarídeos capsulares e LPS são importantes fatores de virulência de *A. baumannii*. Notavelmente, muitos isolados de pacientes com infecções por *A. baumannii* expressam polissacarídeos capsulares superficiais e contêm um cluster genético conservado, chamado locus K, que pode determinar a produção de polissacarídeos capsulares (LEE *et al.*, 2017). Estudos utilizando análises bioquímicas e bioinformáticas, sugeriram que *A. baumannii* produz lipoligossacarídeos (LOS), onde é ausente a unidade de repetição de antígeno-O, ligado ao cerne oligossacarídeo, devido à falta do gene *waaL*, o qual permeia a ligação do antígeno-O (KENYON e HALL, 2013). A biossíntese de glicoproteínas ligadas ao antígeno O é requerida para a glicosilação de proteínas e produção do polissacarídeo capsular em *A. baumannii* e está diretamente envolvido na patogenicidade deste microrganismo (KINSELLA *et al.*, 2015).

A formação de biofilmes em *A. baumannii* é um dos fatores de virulência diretamente relacionados com a permanência no paciente hospitalizado. A formação de biofilmes é especialmente importante em IRAS, pois o uso de cateteres e ventiladores proporcionam superfícies ideais para aderência da bactéria e consequente formação do biofilme, promovendo a colonização e posterior infecção do paciente (DJERIBI, 2012). Nas etapas de formação de

biofilme participam diversos genes, entre eles o *ompA*, principal proteína de membrana externa, e o *csuE*, envolvido na formação do sistema pili, de forma que a inativação desse gene elimina a produção de pili e a formação de biofilme (SELASI *et al.*, 2016). O biofilme formado por isolados de *A. baumannii* possibilita a resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e às terapias antimicrobianas (CHEN, 2015), considerado um dos mais importantes e frequentes fatores de virulência em isolados clínicos de *A. baumannii* (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014). Estas estruturas denominadas biofilmes compreendem comunidades multicelulares tridimensionais, onde as células são envolvidas em uma matriz composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (CHOI *et al.*, 2008).

A fosfolipase é uma enzima lipolítica essencial para o metabolismo de fosfolipídios e é um fator de virulência em muitas bactérias, como como *P. aeruginosa*, *Legionella monocytogenes* e *Clostridium perfringens* (CAMARENA *et al.*, 2010; FLORES-DIAZ *et al.*, 2016). Três classes de fosfolipases, como a fosfolipase A (PLA), fosfolipase C (PLC) e fosfolipase D (PLD) têm sido relacionadas com a degradação de fosfolipídios, afetando a estabilidade da membrana da célula hospedeira, interferindo na sinalização celular e resultando em alterações no sistema imunológico do hospedeiro resposta (FLORES-DIAZ *et al.*, 2016). A fosfolipase C e D foram identificadas como fatores importantes na virulência e na invasão de células hospedeiras por *A. baumannii* (CAMARENA *et al.*, 2010; JACOBS *et al.*, 2010; STAHL *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2017).

A patogênese de *A. baumannii* depende inicialmente da captação e utilização de ferro, elemento essencial envolvido nas funções celulares básicas. As bactérias patogênicas respondem a limitação de ferro através da expressão de diferentes sistemas de captação de ferro dependentes ou não de sideróforos (PENWELL *et al.*, 2012), também possui sideróforos de ferro e acinetobactina, o mais caracterizado sideróforo, onde a acinetobactina é um fator de virulência de *A. baumannii* (GADDY *et al.*, 2012; PENWELL *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que quando a biossíntese e o transporte de acinetobactina são deficientes, a cepas *A. baumannii* ATCC 19606 perdem significativamente a capacidade de persistir dentro das células epiteliais e causar dano celular e morte animal (GADDY *et al.*, 2012). Uma mutação no gene *entA*, que é essencial para a biossíntese do precursor da acinetobactina 2,3-ácido dihidroxibenzóico, também reduz significativamente a capacidade de cepas de *A. baumannii* ATCC 19606 a persistirem dentro das células alveolares humanas (Penwell *et al.*, 2012). Outro estudo mostrou que a produção de acinetobactina é mais frequentemente em isolados de *A. baumannii* MDR do que em isolados avirulentos (MEGEED *et al.*, 2016).

O aumento e a importância crescente de surtos causados por isolados patogênicos de *A. baumannii*, tem levado a comunidade científica e médica a tentar compreender os mecanismos causadores de doenças desses microrganismos, com grande interesse em novas estratégias de tratamento visto a escassez de novos recursos para o combate desse patógeno que vem causando infecções de difícil tratamento (WEBER; HARDING; FELDMANB, 2016; KROGER *et al.*, 2017).

### 3.3 Resistência aos Antimicrobianos em *A. baumannii*

A extensa resistência de isolados de *A. baumannii* a diferentes classes de antimicrobianos pode comprometer o tratamento de infecções causadas por este microrganismo e é considerado uma das mais importantes razões para altas taxas de mortalidades das infecções causadas por este patógeno (VILA; PACHÓN, 2012).

A resistência aos antibióticos em *A. baumannii* pode ser conferida por diferentes mecanismos, tais como: alteração/modificação/eliminação do alvo do antibiótico, produção de enzimas que inativam o antimicrobiano, alterações na permeabilidade da membrana externa e a superprodução de bombas de efluxo (LEE *et al.*, 2017; TEMGOUA E WU, 2019). A ampla resistência desta espécie a múltiplos antimicrobianos está relacionada ainda à capacidade de adquirir e incorporar facilmente elementos genéticos móveis tais como plasmídeos, transposons e integrons (NEONAKIS; SPANDIDOS; PETINAKI, 2011; ATROUNI *et al.*, 2016). Nas últimas décadas a disseminação de resistência entre isolados de *A. baumannii* vem aumentando no mundo inteiro dificultando o tratamento de infecções até mesmo com medicamentos clinicamente disponíveis como tigeciclina, colistina e carbapenêmicos (ATROUNI *et al.*, 2016).

*A. baumannii* apresenta alta quantidade de enzimas antimicrobianas inativadoras, codificadas por genes localizados em plasmídeos e cromossomos, de fármacos da classe dos  $\beta$ -lactâmico (ZHAO *et al.*, 2015). Com base na homologia de sequência, as  $\beta$ -lactamases são agrupadas em classes moleculares, A, B, C e D (JEON *et al.*, 2015). Todas as quatro classes de  $\beta$ -lactamases foram identificadas em *A. baumannii*. Estudos recentes têm demonstrado que *A. baumannii* possui competência natural para incorporar DNA exógeno e seu genoma tem DNA estranho em alta frequência, implicando em transferências horizontais de genes de resistência (RAMIREZ *et al.*, 2010a; TOUCHON *et al.*, 2014; TRAGLIA *et al.*, 2014). Isolados clínicos

de *A. baumannii* que adquiriram o gene *ampC* apresentam resistência à ceftazidima. As  $\beta$ -lactamases da classe C conferem resistência às cefamicinas (cefoxitina e cefotetan), penicilinas e cefalosporinas, mas não são significativamente inibidas por inibidores da  $\beta$ -lactamase, como o ácido clavulânico (JEON *et al.*, 2015).

As  $\beta$ -lactamases da classe D são chamadas OXAs (oxacilinases), porque elas geralmente hidrolisam muito mais rápido a oxacilina isoxazolilpenicilina do que a benzilpenicilina (JEON *et al.*, 2015). Mais de 400 enzimas do tipo OXA foram identificadas e muitas variantes realmente possuem atividade de carbapenemase. A presença de  $\beta$ -lactamases ou MBLs da classe D de hidrólise de carbapenêmicos é um dos os principais mecanismos de resistência ao carbapenem em *A. baumannii* (LIN e LAN, 2014). Os subgrupos de hidrólise de carbapenem OXAs, como OXA-23, OXA-24, OXA-51 e OXA-58 subgrupos, são prevalentes em *A. baumannii*. A enzima OXA23 foi identificada pela primeira vez em um isolado de *A. baumannii* no Reino Unido em 1985 (PEREZ *et al.*, 2007). O gene *blaOXA-23* é disseminado em todo o mundo, e a frequência de estirpes de *A. baumannii* produtoras de OXA-23 são significativamente altas (MUGNIER *et al.*, 2010; AL-AGAMY *et al.*, 2016).

A resistência de *A. baumannii* aos aminoglicosídeos ocorre mais comumente pela presença de genes codificadores de Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMAs) que inativam ou modificam esses fármacos, como acetiltransferases, nucleotidiltransferases e fosfotransferases que medeiam a resistência a gentamicina, tobramicina e amicacina. Akers e colaboradores (2010), observaram que a diminuição da efetividade da amicacina sobre *A. baumannii* MDRs deve-se a presença de genes codificadores de EMA's. Outros mecanismos importantes de resistência a estes antimicrobianos são a metilação do 16S rRNA que impede a ligação do antibiótico e confere resistência de alto nível a todos aminoglicosídeos com relevância clínica, como por exemplo a gentamicina, tobramicina e amicacina; e o efluxo ativo desses antibióticos (LI *et al.*, 2015; ZOU *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2017; TEMGOUA e WU, 2019).

A resistência às fluoroquinolonas em *A. baumannii* deve-se à presença de mutações, sobretudo na região QRDR (do inglês “quinolone resistance determining region”), em genes que codificam para as subunidades que constituem estas duas enzimas: *gyrA* e *gyrB* (DNA girase) e *parC* e *parE* (topoisomerase IV) (HAMOUDA; AMYES, 2004; VILA *et al.*, 2007). Muitos antibióticos da classe quinolonas são também substratos alvos para as bombas de efluxo multidrogas, incluindo as bombas AdeABC e a AdeM (SU *et al.*, 2005; VILA *et al.*, 1997).

*A. baumannii* apresenta resistência à ação das tetraciclinas através da proteção ribossomal, mediada pelos genes *tet(M)* e *tet(O)* e o efluxo, mediada pelos genes *tet(A)* e *tet(B)*

(PELEG *et al.*, 2008). A resistência ao trimetoprim e sulfametoxazol ocorre principalmente pela modificação do alvo através da presença de genes que codificam para variantes alternativas das enzimas alvo destes antibióticos (FALAGAS *et al.*, 2015). A resistência à rifampicina em *A. baumannii* ocorre por mutações no gene *rpoB* (que codifica para a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase), o que impede a ligação deste antibiótico ao alvo (GOLDSTEIN, 2014). Adicionalmente, pode ocorrer por alterações da permeabilidade da ME e efluxo ativo deste agente (PELEG *et al.*, 2008).

Embora ainda pouco reportada, a resistência a colistina torna-se emergente em *A. baumannii* (SNITKIN *et al.*, 2013). Os mecanismos mais comuns de resistência à colistina em *A. baumannii* são a perda do LPS, pela presença de mutações ou elementos de inserção nos genes que codificam o lípido A, resultando na diminuição da carga negativa da membrana bacteriana e consequente diminuição na capacidade de ligação da colistina, que tem carga positiva (CAI *et al.*, 2012; BECEIRO *et al.*, 2011). Outros possíveis mecanismos incluem a inativação enzimática do antibiótico e efluxo (ADAMS *et al.*, 2009).

### **3.4 Sistema de Efluxo em *A. baumannii***

Nos últimos anos, devido à baixa absorção de drogas pela membrana externa (OM), os sistemas de efluxo de drogas tornaram-se um dos mecanismos de resistência bacteriana mais prevalentes e desempenharam um papel essencial na resistência a drogas, especialmente para *A. baumannii* (HOOD *et al.*, 2010). A estrutura do sistema de efluxo é composta de 3 partes bem definidas, cada uma desempenhando uma função no mecanismo de efluxo da droga, incluindo a membrana externa (OM), a membrana interna (IM) e a proteína de fusão no nível intermediário (MFP) (YONEHARA *et al.*, 2016). Cada parte da estrutura da bomba tem um certo fator causando resistência a aproximadamente todos os grupos de antibacterianos (PENWELL *et al.*, 2015; WRIGHT, 2011).

Muitas espécies de bactérias possuem sistemas para expulsão de substâncias nocivas à célula, sem modificá-las ou degradá-las, chamados sistemas de efluxo. Em bactérias Gram negativas, estes sistemas são formados pela associação, geralmente, de três subunidades: bomba (na membrana citoplasmática, que exerce a atividade de expelir substâncias), canal de saída (porina, na membrana externa) e uma proteína ligadora (ligando a bomba a porina). Do ponto de vista de resistência a antibióticos, esses sistemas possuem grande habilidade para expelir

antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e, em alguns casos, aminoglicosídeos (KUMAR; SCHWEIZER, 2005).

As bombas de efluxo representam uma classe de transportadores envolvidos na captação de nutrientes essenciais e íons, excreção de produtos de metabolismo bacteriano e de substâncias tóxicas, além de participarem também em processos de comunicação entre células, com o meio ambiente e está relacionada a patogenicidade bacteriana durante a colonização e sobrevivência do microrganismo no hospedeiro (MAGNET *et al.*, 2001)

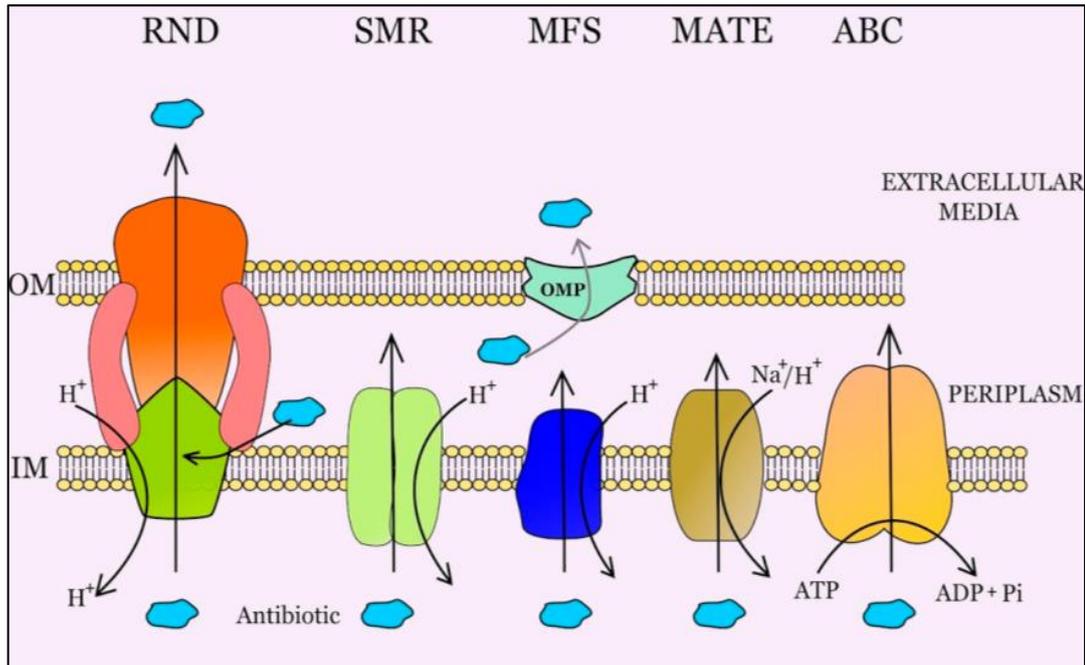
Sistemas de efluxo são formados por proteína única ou por complexo de proteínas transmembrana. De acordo com a sequência de aminoácidos da proteína, os sistemas de efluxo são classificados em cinco grupos: ATP-binding cassettes superfamily (ABC); major facilitator superfamily (MFS); resistance nodulation-cell division superfamily (RND); multidrug and toxic compounds extrusion (MATE) e small family multidrug resistance (SMR) (KUMAR; SCHWEIZER, 2005; PAGÈS; MASI; BARBE, 2005).

#### I) Família “ATP-binding cassette” (ABC)

A família ABC é alimentada por fontes de energia de hidrólise de ATP (ADP + Pi) que dá resistência celular a um grande número de moléculas de antibióticos (LOCHER, 2016; LÓPEZ *et al.*, 2016). As estruturas dos transportadores ABC revelam domínios transmembranares (TMDs) que contêm bolsas de ligação a substratos e ligações a domínios de nucleotídeos (NBDs) que se ligam e hidrolisam o ATP para conduzir o ciclo de transporte (CHOUDHURY *et al.*, 2014; VERHALEN *et al.*, 2017).

No que se diz respeito ao efluxo de drogas, *A. baumannii* tem sido relatado como abrigando proteínas de efluxo de todas as principais famílias de bombas de efluxo (VILA *et al.*, 2007). O gene *AIS\_1535* é o primeiro de resistência a drogas ABC identificado em *A. baumannii*, e confere resistência à 1,10-fenantrolina, gentamicina, canamicina, cloranfenicol, oxitetraciclina e cloroxilenol (LI *et al.*, 2016).

O principal sistema de efluxo envolvido nos mecanismos de resistência pertence ao grupo dependente da força próton motiva, visto que os mais importantes são da família: RND, MFS e SMR (VILA *et al.*, 2007). Em *A. baumannii*, a resistência aos antimicrobianos está associada com as famílias MFS e RND, onde essa última consiste em um sistema tripartido, denominado de AdeABC, demonstrado na Figura 1.



**Figura 1.** Representação esquemática dos principais tipos de sistemas de efluxo bacteriano. Ilustração esquemática das cinco principais famílias de transportadores de efluxo: a família de divisão de resistência a nodulação (RND), a família de pequenas resistências a múltiplas drogas (SMR), a grande família facilitadora (MFS), a família de múltiplas drogas e extrusão de compostos tóxicos (MATE) e cassete de ligação ao trifosfato de adenosina (ATP). OM: Membrana externa. OMP: Proteína da membrana externa (BLANCO *et al.*, 2016).

O sistema AdeABC pertencente à família RND, foi o primeiro a ser descrito e é o mais prevalente em *A. baumannii*. Este sistema consiste em uma maquinaria de efluxo constituída por três porções: uma proteína de fusão (AdeA), um transportador de multidrogas (AdeB) e um fator de membrana externa (AdeC). A expressão da AdeAB é regulada por um sistema regulador AdeR-AdeS (MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001; COURVALIN; PE, 2011).

AdeIJK, que também é da mesma família RND é a segunda bomba de efluxo mais predominante em *A. baumannii* e é homólogo ao AdeABC, porém não possui um sistema regulatório ainda esclarecido (COURVALIN; PE, 2011). Embora existam evidências que comprovam o envolvimento do sistema AdeIJK na redução de susceptibilidade aos biocidas em *A. baumannii*, os dados existentes são ainda pouco esclarecedores e relativamente escassos (GOVINDAN RAJAMOHAN, 2009; LIN *et al.*, 2017; NOWAK; SEIFERT; HIGGINS, 2015; RAJAMOHAN; SRINIVASAN; GEBREYES, 2010).

O brometo de etídeo também é um composto que é eliminado através dos principais sistemas de efluxo em *Acinetobacter spp.* (AdeABC). Ensaios de monitoramento do acúmulo

intracelular de brometo de etídeo são utilizados como triagem para avaliação de atividade aumentada de sistema de efluxo (CHO *et al.*, 2001; GIRAUD *et al.*, 2000).

## II) “Major facilitator superfamily” (MFS)

O grupo MFS é encontrado em todos os domínios da vida e é a maior e mais diversa família de transportadores. O grupo abrange uniporters (que movem substratos através da bicamada lipídica sem íons de acoplamento), simporters (que acoplam o transporte com o transporte de íons na mesma direção que o substrato) e antiporters (que facilitam o movimento de íons e substratos em direções opostas). A maioria dos membros dessa superfamília funciona como unidades monoméricas únicas (RADESTOCK; FORREST, 2011). O transportador AbaF (MFS) é responsável pela resistência à fosfomicina em *A. baumannii* (SHARMA *et al.* 2017). AbaQ, uma bomba de efluxo MFS, foi identificada em *A. baumannii* envolvida não apenas na extrusão de quinolona, mas também na motilidade e virulência associadas à superfície (PÉREZ-VARELA *et al.*, 2017; PÉREZ-VARELA *et al.*, 2018). Em 2016, Li e colaboradores identificaram a proteína A1S\_2795, a primeira proteína MFS de resistência a medicamentos, que confere resistência ao sulfonamida e sulfatiazol.

## III) Família “Resistance nodulation cell division” (RND)

As bombas de efluxo da família Resistência-nodulação-divisão (RND) em *A. baumannii* são responsáveis pela resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprim e brometo de etídeo (NOWAK *et al.*, 2015). Foram caracterizados três sistemas de efluxo de drogas da família RND em *A. baumannii*: AdeABC, AdeFGH e AdeIJK (YOON *et al.* 2015). Os sistemas de efluxo RND, são composto por uma proteína de membrana interna (bomba RND) ligada por uma proteína adaptadora periplasmática (PAP) e a um fator de membrana externa (OMF) que podem extrudir uma ampla gama de substratos frequentemente não relacionados à estrutura (NIKAIDO; PAGÈS, 2012).

#### IV) Família “Multidrug and toxic compound extrusion” (MATE)

Os transportadores da família MATE são alimentados por um duplo reservatório de energia PMF (força próton-motiva) e pelo gradiente de íons sódio  $\text{Na}^+$  (NI *et al.*, 2016). O primeiro e mais frequente gene da família MATE presente em *A. baumannii* é o gene *adeM*. Representa entre 63 - 100% em resistência a multidrogas para *A. baumannii* (BLANCO *et al.*, 2016; CHANG; SXEWCZYK; HE, 2013). Assim, o gene *adeM* é visto como um alvo importante para a elaboração de inibidores de bombas de efluxo que podem ajudar a restaurar a sensibilização por *A. baumannii* (TENGOUA; WU, 2019).

#### V) Família “Small multidrug resistance” (SMR)

As proteínas da família SMR conferem resistência a compostos de amônio quaternário e outros cátions lipofílicos em arqueias e bactérias. Eles são realmente pequenos, possuindo apenas quatro segmentos de transmembranas (TMHs), mas funcionam como homodímeros ou heterodímeros (BAY; ROMMERS; TURNER, 2008).

Durante o processo de transporte, a bomba alterna entre os estados voltado para o interior e o exterior, através da troca conformacional dos dois protômeros. Portanto, os dois estados são idênticos, exceto que possuem orientação oposta na membrana (MORRISON *et al.*, 2012). Tais movimentos conformacionais globais são modulados de maneira alostérica por protonação de *E14* (Ciclo glutâmico 14) em TMH1 (*E14* – resíduo essencial no TMH1 para ligação ao substrato e ao próton) que causa extensa rotação e inclinação de TMH1, TMH2 e TMH3 em conjunto com a reembalagem de loops (DASTVAN *et al.*, 2016; GAYEN; LENINGER; TRAASETH, 2016). As propriedades do substrato afetam a taxa de transporte da bomba e a substituição de um único resíduo na câmara de ligação de drogas pode alterar a especificidade das bombas SMR (LYTVYNENKO *et al.*, 2016; BRILL *et al.*, 2015).

### 3.5 Tratamento de Infecções por *A. baumannii*

O tratamento de infecções por *A. baumannii* vem sendo gradualmente reduzido a um número limitado de antimicrobianos, devido a sua habilidade de adquirir inúmeros mecanismos

de resistência. Nos últimos 20 anos, o panorama mundial da espécie *A. baumannii* é caracterizado pelo aumento de cepas multirresistentes em todas as regiões do mundo, com importantes reduções nas taxas de susceptibilidade a inúmeros agentes antimicrobianos (GALES *et al.*, 2018).

Desde o início de 1970, isolados de *Acinetobacter spp.* tem progressivamente acumulado resistência, principalmente, aos beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos (COELHO *et al.*, 2006). No ambiente hospitalar, o tratamento de infecções por *A. baumannii* é realizado, principalmente, com beta-lactâmicos, sendo os carbapenêmicos imipenem e meropenem os mais prescritos para o tratamento de infecções graves por cepas multirresistentes (JEAN *et al.*, 2013; PAPP-WALLACE *et al.*, 2011; SHAH; ISAACS, 2003).

Os aminoglicosídeos ainda são considerados como uma importante opção terapêutica sendo usados em combinação com outras classes de antimicrobianos, principalmente os beta-lactâmicos (FISHBAIN; PELEG, 2010). Fernández-Cuenca e colaboradores (2013) isolaram 446 amostras de *A. baumannii* em 43 hospitais espanhóis e observaram que 94% das cepas foram resistentes a ceftazidima, piperacilina e ciprofloxacina; 82-86% para carbapenêmicos e tetraciclina; 60-70% para tobramicina, sulbactam, gentamicina e doxiciclina; 49% para amicacina; 30% para minociclina e rifampicina; 24% para tigeciclina e 3% resistente a colistina.

O aparecimento de linhagens multirresistentes de microrganismos impulsionou a busca por alternativas terapêuticas visando o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, de modo que as plantas e seus metabólitos com potencial microbiocida se tornem alvo de muitas pesquisas. Um estudo realizado por Melo e colaboradores (2018) mostrou que a fração acetilênica e o extrato bruto de *Clitoria ternatea* apresentam atividade contra *A. baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente produtoras de metalo-beta-lactamases (MBL), enzima inibidora de carbapenêmicos.

A busca de novos compostos naturais com ação antimicrobiana se apresenta como um modelo experimental, ecologicamente correto, para se produzir substâncias que sejam eficazes e menos agressivas ao meio ambiente e aos homens, contribuindo, assim, com a melhoria da qualidade de vida (DE MELO, 2013). Desse modo, esta busca por terapêuticos para microrganismos resistentes estimulam o potencial microbiocida de plantas e seus metabólitos como as alcanidas naturais, isolada do fruto verde de *Aniba riparia* (Nees) Mez, pertencente à família Lauraceae.

### 3.6 Família Lauraceae

A família Lauraceae é amplamente distribuída nas regiões de clima tropical e subtropical, concentrando-se principalmente na Ásia e na América. Devido a suas características morfológicas e anatômicas se assemelharem a outras famílias como Calycanthaceae, Idiospermaceae e Hernandiaceae, a família Lauraceae é considerada uma das famílias mais primitivas do filo Magnoliophyta (CRONQUIST, 1988). Possui 67 gêneros e cerca de 2500 espécies, sendo encontrada em países de ampla biodiversidade, como é o caso do Brasil, que possui aproximadamente 25 gêneros e 400 espécies de plantas. Ainda, segundo Custodio e Veiga Junior (2014) várias espécies são empregadas na obtenção de produtos de grande valor econômico na área de alimentos e na indústria madeireira, e outras são usadas na medicina tradicional para tratar lesões na pele, desordens gastrointestinais e problemas circulatórios e algumas espécies demonstraram efeito anti-inflamatório, propriedades hipoglicemiantes e efeitos centrais.

O gênero *Aniba* compreende espécies de arbustos e árvores de planície, sendo vastamente encontrado na Amazônia e Guianas. A espécie *Aniba riparia* (Ness) Mez (Figura 2), conhecida popularmente como “louro”, pode ser destacada pela sua importância econômica. Dela pode ser obtido um extrato dos frutos e dos cálices persistentes que possuem atividade farmacológica comprovada cientificamente (MARQUES, 2001).



Fonte: <http://fm2.fieldmuseum.org/vrrc/max/LAUR-anib-ripa-ecu-2188224.jpg> (acesso em: 05/2019).

**Figura 2:** Exsicata *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae).

### 3.7 *Aniba riparia* e as Riparinas

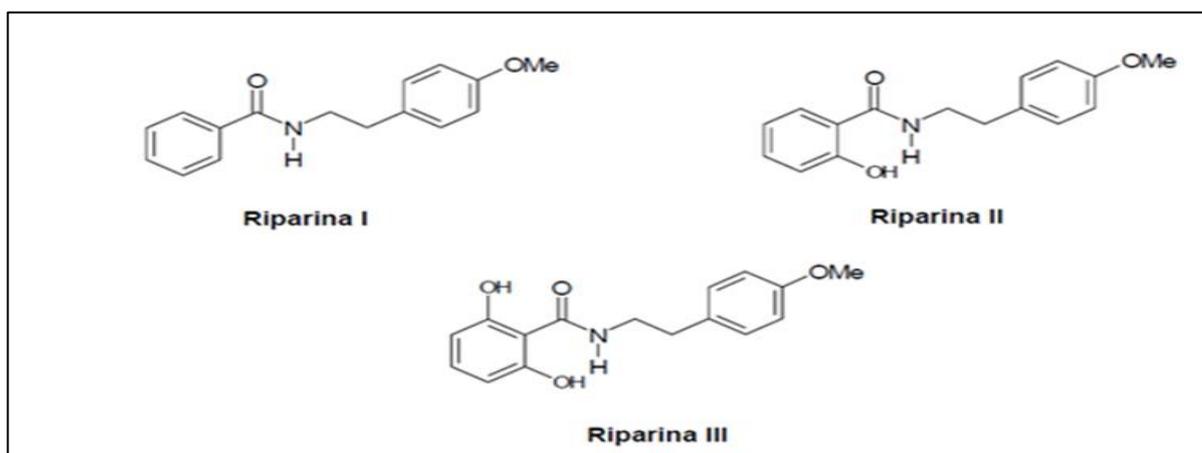
Essa planta apresenta algumas características peculiares, tais como, folhas cartáceas, foscas em ambas as faces, reticulação aureolada, ramos de 3 mm de espessura, marrons e

lenticelados, pecíolo canaliculado, engrossado na base e gema terminal menor que 4 mm (VICENTINI *et al.*, 1999; MARQUES, 2001).

*Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), apresenta uma classe de alcaloides contendo uma função alcanida. Após a elucidação estrutural de um dos seus compostos o (O-metil-) -N-(2-hidroxibenzoil) tiramina foi verificado que, biogeneticamente, esta molécula é resultado da condensação de duas substâncias: o éter metílico da tiramina, agente simpaticomimético, e o ácido salicílico, agente queratolítico e antimicótico (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987).

Foram encontrados flavonoides, benzoilbenzoatos e benzaldeídos em estudos químicos realizados nas cascas do caule de *A. riparia*. Estudos demonstraram também que há a presença de neoglicanas, benzilbenzoatos, feniletilaminas (O-metil-tiramina) e que estes alcaloides, especificamente alcanidas (feniletilamidas do ácido benzóico) estão presentes no fruto verde da planta (Figura 2) (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1987).

A partir do fruto verde da *Aniba riparia*, podem ser isoladas as tiraminas conjugadas (Figura 3) N-benzoil-tiramina (riparina I) e os seus análogos N-2-hidroxi-benzoil-tiramina (riparina II) e N-2,6-dihidroxi-benzoil-tiramina (riparina III).



**Figura 3.** Riparinas isoladas de *Aniba riparia* (Ness) Mez. Riparina I (N-benzoiltiramina), Riparina II (N-(2-hidroxibenzoil) -tiramina) e Riparina III (N-(2,6-dihidroxibenzoil) -tiramina).

**Fonte:** (CASTELO-BRANCO *et al.* 2000)

Algumas evidências mostram que o extrato dos frutos e dos cálices persistentes de *Aniba riparia* apresentam efeitos antimicrobianos contra *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiela pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (MARQUES, 2001).

### 3.8 Análogos Sintéticos

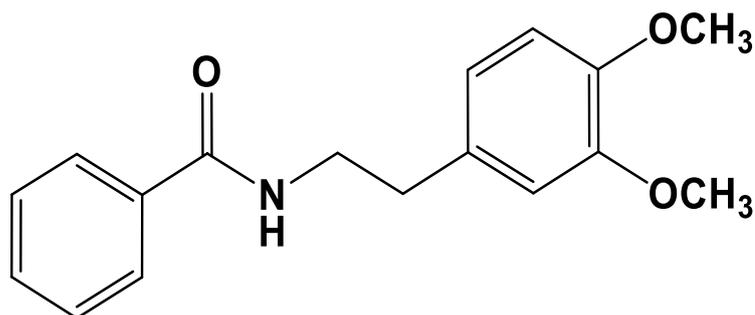
A atividade antinociceptiva de constituintes da *A. riparia* foi analisada em testes com a riparina I em modelos comportamentais de dor induzida química e termicamente em roedores. Os resultados obtidos sugerem que a riparina I apresenta atividade antinociceptiva relacionada a mecanismos periféricos (via do óxido nítrico) e mecanismos centrais, descartando o envolvimento do sistema opióide (ARAÚJO *et al.*, 2009).

A riparina II tem demonstrado efeito inibitório - direto ou indireto - sobre a atividade, produção ou liberação de mediadores pró-inflamatórios envolvidos na geração de dor associada à inflamação, (DE CARVALHO *et al.*, 2013) e significativa atividade antidepressiva (TEIXEIRA *et al.*, 2013). A riparina III, administradas intraperitonealmente ou oralmente, também mostrou atividade antidepressiva e ansiolítica em roedores, (SOUSA *et al.*, 2004; DE MELO *et al.*, 2013). E, as três riparinas naturais demonstraram atividade antimicrobiana em cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (CATÃO *et al.*, 2010).

Em adição a ocorrência natural de moléculas originárias na *A. riparia*, usando a reação de Schotten-Bauman, Gutierrez e colaboradores (2005) obtiveram análogos sintéticos chamados de Riparinas A, B, C, D, E e F.

Costa (2013) estudou a atividade antioxidante, o potencial antiesquistossoma e a citotoxicidade *in vitro* das riparinas A, B, C, D, e E. Quanto ao potencial antioxidante, todas as riparinas demonstraram significativa atividade. Os resultados tornaram evidente que as riparinas A-F, especialmente as riparinas B, C, E e F apresentaram atividade anti-helmíntica satisfatória contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Quanto à citotoxicidade, a Riparina F foi a substância mais citotóxica, seguida pelas Riparinas C, D e E. As riparinas A e B demonstraram ter pouca ou nenhuma toxicidade.

Santiago *et al.* (2015) apontaram que a Rip B (Figura 4) pode inibir as vias inflamatórias modulando a formação de sinais patológicos de inflamação incluindo edema da pata induzido por vários mediadores, migração de neutrófilos, liberação de citocinas e hiperalgesia.



**Fonte:** Santiago *et al.* (2015).

**Figura 4.** Estrutura química da Riparina-B (*N*-[2-(3,4-dimetoxi-fenil) etil] -benzamida).

Essa alcaloide é capaz de induzir, de forma não-específica e reversível, o relaxamento das contrações produzidas por acetilcolina e histamina em íleo de cobaia e por ocitocina e bradicinina em útero de rata virgem, com valores de CI<sub>50</sub> variando de 1,7 a 5 µg/mL (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000).

Em estudos anteriores a Riparina-B também foi capaz de causar redução da pressão arterial e da frequência cardíaca em ratos acordados e não estressados na dose de 1 mg/kg, via intraperitoneal, o que parece envolver um componente de origem parassimpática (SEIXAS, 1996).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Linhagens bacterianas

Os ensaios foram realizados utilizando-se cepas de *Acinetobacter baumannii* que fazem parte do acervo microbiológico do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia. Trata-se de uma bacterioteca com 106 amostras bacterianas com identificação prévia e confirmatória para o gênero *Acinetobacter*, isoladas de diferentes espécimes clínicos, provenientes de pacientes com IRAS internados no Hospital de Urgências de Teresina - HUT no período de julho de 2016 à julho de 2017 (CAAE/UFPI 61695516.8.0000.5214). É importante ressaltar que essas amostras foram obtidas em um estudo anterior e que atenderam todos os procedimentos éticos (aprovação em comitê de ética e do referido hospital) e que foram respeitados a confidencialidade e o anonimato dos sujeitos notificados. Todas as cepas do acervo microbiológico são multidrogas resistentes, sendo composto por cepas com ou sem fenótipo de bombas de efluxo para múltiplas drogas. A verificação da ocorrência de resistência mediada por bombas de efluxo dessas cepas foram realizadas por LIMA (2018) por avaliação das CIMs dos antibióticos na presença e na ausência do inibidor de bomba de efluxo Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) (Sigma-Aldrich, Dorset, United Kingdom), em concentração subinibitória. Como critério para classificar presença fenotípica de bomba de efluxo foi considerado uma redução no MIC do antibiótico em pelo menos 2 vezes na presença do CCCP (ADERBILE et al., 2014; LIMA, 2018).

### 4.2 Reagentes

Os antimicrobianos Amicacina, Ceftazidima e Norfloxacin, bem como a Clorpromazina foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. Ltd. (USA) e foram dissolvidos em água destilada esterilizada (Amicacina: 1250 µg/mL, Ceftazidima: 1024 µg/mL e Norfloxacin: 1024 µg/mL, conservados a 8°C, validade e armazenamento: 5 anos). A Riparina-B (N-[2-(3,4-dimetoxifenil) etil] -benzamida) foi sintetizada no Laboratório de Farmacognosia (Departamento de Farmácia, CCS, UFPI) e disponibilizada pelo Prof. Drº Stanley Juan Chavéz Gutierrez.

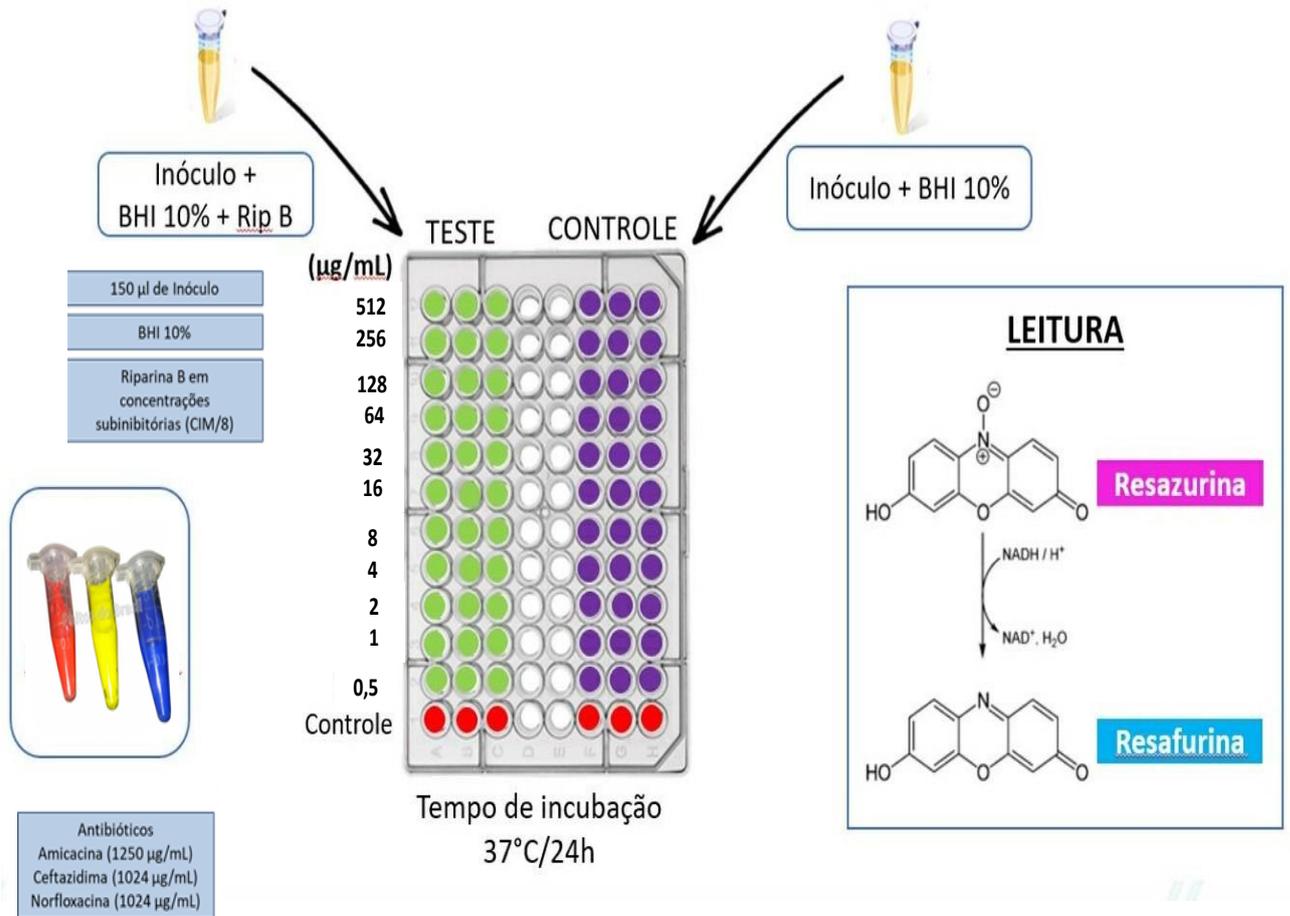
### 4.3 Avaliação da atividade antibacteriana

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia/DPM/CCS. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada através do método de microdiluição com modificações (CLSI, 2013). Neste ensaio foram utilizadas microplacas de 96 poços (8 colunas e 12 linhas) com fundo chato. Soluções estoque da riparina B foi previamente preparada por dissolução de 10.000 µg do produto em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO, MERCK), portanto iniciando com uma concentração de 10.000 µg/mL. Esta solução inicial foi então diluída com água destilada esterilizada para concentrações de 1024 µg/mL.

A CIM do produto teste foi determinada pela microdiluição em caldo BHI com suspensões microbianas de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL e com concentrações do produto variando de 8 a 512 µg/mL. As placas inoculadas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura dos poços visualmente com ou sem crescimento microbiano foram realizadas após adição de 20 µL de uma solução aquosa de resazurina sódica a 0,01% (m/v). A CIM foi definida como a menor concentração da droga na qual não é observado crescimento microbiano. Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM), alíquotas de 5 µL das diluições testadas por microdiluição foram inoculadas nos meios Agar BHI seguido de incubação a 37°C por 24 h.

#### **4.4 Ensaios de modulação da resistência a antibióticos de uso tradicional**

Para avaliação da atividade moduladora da resistência a antibióticos industrializados, a CIM de Amicacina, Ceftazidima e Norfloxacin foram determinadas na presença e na ausência de concentrações subinibitórias da Rip-B ou da CPZ (CIM 1/8). As concentrações dos antibióticos variaram de 512 a 0,5 µg/mL. As placas de microtitulação foram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura dos poços com ou sem crescimento microbiano foi realizada após adição de 20 µL de uma solução aquosa de resazurina sódica a 0,01% (m/v), conforme Figura 5.



Fonte: Autor (2020).

**Figura 5.** Modulação da resistência aos antibióticos industrializados.

#### 4.6 Análise Estatística

Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram normalizados pelo cálculo da média geométrica das CIMs. O erro padrão e o desvio padrão da média foram determinados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, versão 7.00. A ocorrência de diferenças entre os tratamentos foi examinada através da análise de variância de uma etapa (ANOVA). As diferenças foram analisadas através do pós-teste de Bonferroni e foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à alta prevalência de infecções causadas por *A. baumannii* multirresistente, principalmente em ambientes hospitalares, pesquisas de novos agentes antimicrobianos eficazes contra esse patógeno têm sido consideradas prioritárias. No presente estudo, o derivado sintético Rip-B foi investigado por seu potencial antimicrobiano contra diferentes cepas de *A. baumannii* isoladas de um hospital de urgência de Teresina, Piauí, Brasil. Para realização deste estudo, foram selecionadas 18 cepas de *A. baumannii* a partir de uma biblioteca de isolados clínicos de IRAS do Hospital de Urgências de Teresina – HUT, previamente obtidos por Lima (2018). Foram escolhidas seis cepas com resistência para cada uma das drogas testadas (amicacina, ceftazidima e norfloxacin). Dentre as seis cepas pré-selecionadas para cada droga, foram selecionadas três cepas que apresentavam fenótipo de resistência mediada por bomba de efluxo e três cepas com fenótipo de resistência não mediada por bomba de efluxo. As Tabelas 1, 2 e 3 descrevem a origem clínica, perfil de resistência aos antimicrobianos e presença ou não de fenótipo de bomba de efluxo dos isolados de *A. baumannii* resistentes à Amicacina, Ceftazidima e Norfloxacin, respectivamente.

Os resultados dos ensaios para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da Riparina B e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Riparina B (Rip-B) contra isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes à Amicacina, Ceftazidima e Norfloxacin são demonstrados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Um estudo anterior reportou que as riparinas naturais I, III, XII isoladas de *A. riparia* apresentaram atividade antibacteriana contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus* e *Escherichia coli* (CATÃO *et al.*, 2005). Por outro lado, enquanto o análogo sintético Rip-E mostrou uma boa atividade antibacteriana contra cepas de *S. aureus*, o derivado sintético Rip-B foi inativo contra esta espécie *S. aureus* (Costa *et al.*, 2016). Os resultados obtidos no presente estudo foram semelhantes ao encontrado para *S. aureus*, uma vez que a Riparina – B não apresentou atividade antimicrobiana intrínseca contra a maioria das cepas de *A. baumannii* testadas (Tabelas 4, 5 e 6). Dentre as cepas que apresentaram suscetibilidade para a Riparina-B, o perfil de atividade antimicrobiana foi majoritariamente do tipo fraca (CIMs variando de 512 a 1024 µg/mL). A Riparina - B apresentou uma forte atividade intrínseca apenas para cepa HUT 23. Esses resultados mostram que o Rip-B não é recomendado para uso como agente antimicrobiano.

**Tabela 1.** Origem e características fenótipas de resistência dos isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes à Amicacina.

Isolado	Isolamento	Setor do Hospital	µg/mL			Perfil de Resistência
			CIM (AMI)	CIM (AMI + CCCP)	E	
HUT – 12	Aspirado traqueal	Sala Vermelha	512	512	1,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT e TRIME/SULFA.
HUT – 51	Aspirado traqueal	Posto 06	512	512	1,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT, TRIME/SULFA e TIGE.
HUT - 102	Aspirado traqueal	Posto 04	512	512	1,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT, TRIME/SULFA e TIGE.
HUT – 22	Aspirado traqueal	UTI	51	10	5,1	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT e TRIME/SULFA.
HUT – 52	Aspirado traqueal	Posto 04	256	64	4,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT e TRIME/SULFA.
HUT - 103	Aspirado traqueal	Posto 04	256	32	8,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT, TRIME/SULFA e TIGE.

**Legenda:** CCCP (Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona); CEF (Ceftazidima); CIPRO (Ciprofloxacina); LEVO (Levofloxacina); IMI (Imipenem); GEN (Gentamicina); AMI (Amicacina); PIPE + TAZO (Piperaciclina + Tazocin); CEFE (Cefepeme); CEFT (Ceftriaxona); TRIME/SULFA (Trimetropim/Sulfametoxazol). E: representa a diferença entre valores de CIM do antibiótico testado isoladamente e em associação com o CCCP. Valores maiores do que 2 representam a presença fenotípica de sistema de Efluxo.

**Fonte:** (LIMA, 2018).

**Tabela 2.** Origem e características fenótipas de resistência dos isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes à Ceftazidima.

Isolado	Isolamento	Setor do Hospital	µg/mL			Perfil de Resistência
			CIM (CEF)	CIM (CEF+ CCP)	E	
HUT – 23	Secreção Abdominal	Isolamento	2048	2048	1,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT, TRIME/SULFA e TIGE.
HUT – 37	Aspirado traqueal	UTI	1024	1024	1,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT, TRIME/SULFA e TIGE.
HUT – 77	Aspirado traqueal	Posto 04	512	512	1,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT e TRIME/SULFA.
HUT – 83	Aspirado traqueal	Posto 04	406,3	40,3	10,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT e TRIME/SULFA.
HUT – 88	Aspirado traqueal	Posto 04	256	64	4,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT; TRIME/SULFA e TIGE.
HUT – 99	Aspirado traqueal	Posto 04	512	3,1	165,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT, TRIME/SULFA e TIGE.

**Legenda:** CCCP (Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona); CEF (Ceftazidima); CIPRO (Ciprofloxacina); LEVO (Levofloxacina); IMI (Imipenem); GEN (Gentamicina); AMI (Amicacina); PIPE + TAZO (Piperaciclina + Tazocin); CEFE (Cefepeme); CEFT (Ceftriaxona); TRIME/SULFA (Trimetropim/Sulfametoxazol). E: representa a diferença entre valores de CIM do antibiótico testado isoladamente e em associação com o CCCP. Valores maiores do que 2 representam a presença fenotípica de sistema de Efluxo.

**Fonte:** (LIMA, 2018).

**Tabela 3.** Origem e características fenótipas de resistência dos isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes à Norfloxacin.

Isolado	Isolamento	Setor do Hospital	µg/mL		E	Perfil de Resistência
			CIM NOR	CIM (NOR + CCCP)		
HUT – 26	Aspirado traqueal	Posto 04	512	512	1,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT e TIGE
HUT – 41	Aspirado traqueal	Sala Vermelha	256	256	1,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO e TIGE
HUT – 76	Aspirado traqueal	Sala Vermelha	512	512	1,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT, TRIME/SULFA e TIGE
HUT – 89	Aspirado traqueal	UTI	256	50,8	5,03	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT, TRIME/SULFA e TIGE
HUT – 90	Aspirado traqueal	Sala Amarela	256	32	8,0	CEF, CIPRO, LEVO, IMI, MERO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE e TIGE
HUT - 105	Aspirado LCR	UTI	203,1	80,6	2,5	CEF, CIPRO, LEVO, GEN, AMI, PIPE+TAZO, CEFE, CEFT, TRIME/SULFA e TIGE

**Legenda:** CCCP (Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona); CEF (Ceftazidima); CIPRO (Ciprofloxacina); LEVO (Levofloxacina); IMI (Imipenem); GEN (Gentamicina); AMI (Amicacina); PIPE + TAZO (Piperacilina + Tazocin); CEFE (Cefepeme); CEFT (Ceftriaxona); TRIME/SULFA (Trimetropim/Sulfametoxazol). E: representa a diferença entre valores de CIM do antibiótico testado isoladamente e em associação com o CCCP. Valores maiores do que 2 representam a presença fenotípica de sistema de Efluxo.

**Fonte:** (LIMA, 2018).

**Tabela 4.** Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Riparina B (Rip-B) contra isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes à Amicacina.

Estirpes	Fenótipo de Efluxo	(µg/mL)			Efeito Inibidor
		CIM	CBM	CBM/CIM	
HUT - 12	Não	1024	-	-	Sem atividade
HUT - 51	Não	1024	-	-	Sem atividade
HUT - 102	Não	512	512	1.0	Bactericida
HUT - 22	Sim	512	512	1.0	Bactericida
HUT - 52	Sim	512	512	1.0	Bactericida
HUT - 103	Sim	1024	-	-	Sem atividade

**Tabela 5.** Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Riparina B (Rip-B) contra isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes à Ceftazidima.

Estirpes	Fenótipo de Efluxo	(µg/mL)			Efeito Inibidor
		CIM	CBM	CBM/CIM	
HUT - 23	Não	128	128	1.0	Bactericida
HUT - 37	Não	512	512	1.0	Bactericida
HUT - 77	Não	1024	-	-	Sem atividade
HUT - 83	Sim	512	512	1.0	Bactericida
HUT - 88	Sim	1024	-	-	Sem atividade
HUT - 99	Sim	1024	-	-	Sem atividade

**Tabela 6.** Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Riparina B (Rip-B) contra isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* resistentes à Norfloxacin.

Estirpes	Fenótipo de Efluxo	(µg/mL)			Efeito Inibidor
		CIM	CBM	CBM/CIM	
HUT – 26	Não	1024	-	-	Sem atividade
HUT – 41	Não	1024	-	-	Sem atividade
HUT – 76	Não	1024	-	-	Sem atividade
HUT – 89	Sim	1024	-	-	Sem atividade
HUT – 90	Sim	1024	-	-	Sem atividade
HUT – 105	Sim	1024	-	-	Sem atividade

Por outro lado, um outro estudo utilizando com Riparina III em associação com a penicilina, verificou que este alcaloide, isolado de *A. riparia*, foi o capaz de sensibilizar linhagens de *S. aureus* com resistência plasmidial à penicilina, através da eliminação do plasmídeo (CATÃO *et al.*, 2010). No presente estudo, a Riparina – B foi também avaliada quanto sua capacidade de potencializar a atividade dos antibióticos amicacina, ceftazidima e norfloxacin, com o objetivo de sugerir um possível uso do Rip-B como adjuvante desses antibióticos no tratamento de infecções por *A. baumannii*.

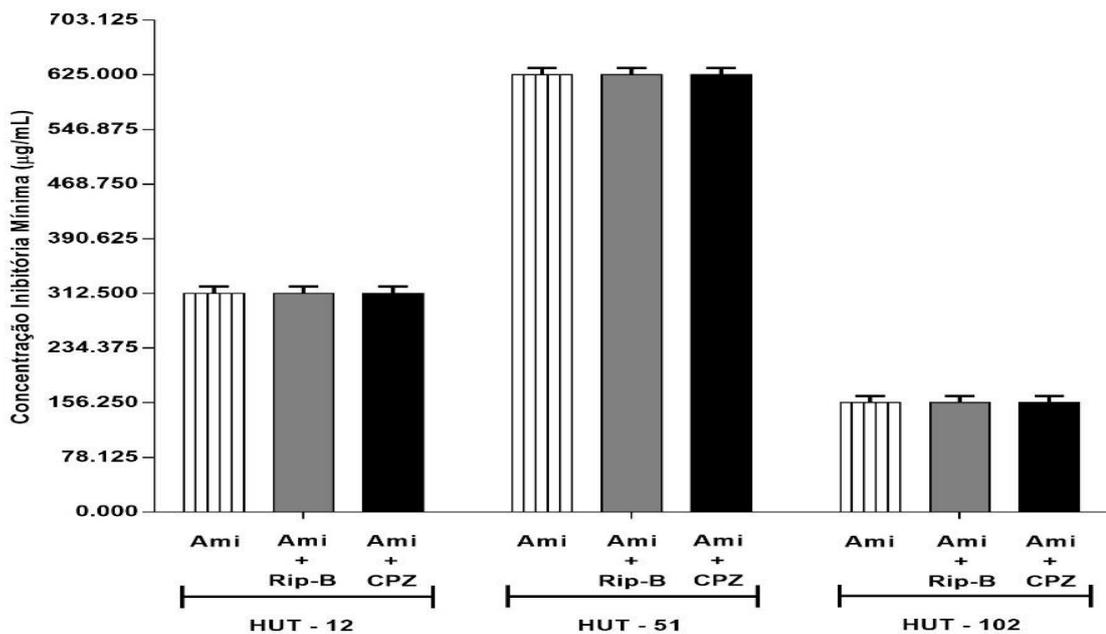
### 5.1 Amicacina

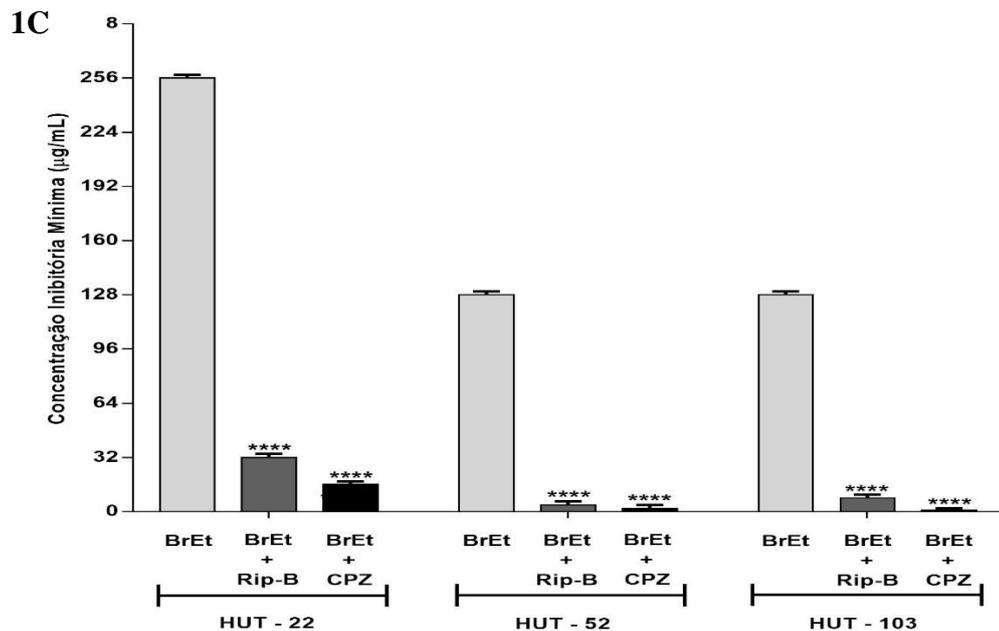
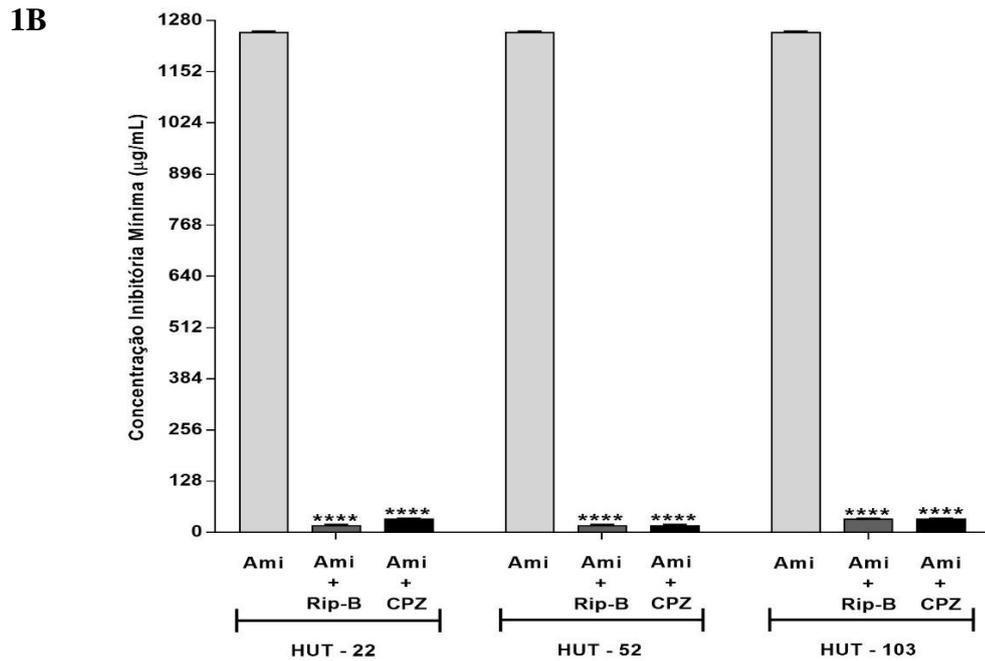
O gráfico 1 mostra a CIM da amicacina na presença ou ausência de Riparina B e CPZ para cepas sem fenótipo de bomba de efluxo (1A) e com fenótipo de bomba de efluxo (1B). A amicacina apresentou valores de CIM no intervalo de 156,25 a 1.250 µg/mL.

No gráfico 1A, observa-se que não há diferença significativa dos valores de CIM da droga sozinha, associada a RIP B ou a CPZ, de modo que a associação com o inibidor de

bomba CPZ não modifica a concentração mínima da droga necessária para sua ação antibacteriana. Esses resultados corroboram com os ensaios fenotípicos anteriormente realizados com CPPP que indicam que essas cepas não apresentam resistência à amicacina pelo mecanismo de bomba de efluxo. Contudo, no gráfico 1B, observa-se que na presença de CPZ as cepas HUT 22, 52 e 103 apresentaram uma redução da CIM de mais de 40 vezes. Essas cepas também apresentaram drástica diminuição da CIM na presença de Riparina-B. As cepas HUT 22 e 52, tiveram as CIMs reduzidas pela Rip-B em mais de 78 vezes (de 1250 para 16 µg/mL) e a HUT – 103, teve a CIM reduzida de 1250 para 32 µg/mL. Quando a CIM foi avaliada utilizando-se o brometo de etídio, um substrato conhecido de bomba de efluxo houve intensa diminuição da CIM na associação com Rip B e CPZ. Observou-se ainda que, a associação de Rip – B com o brometo de etídio resulta em significante redução da CIM, semelhantemente ao ocorrido na presença do inibidor CPZ (1C).

### 1A





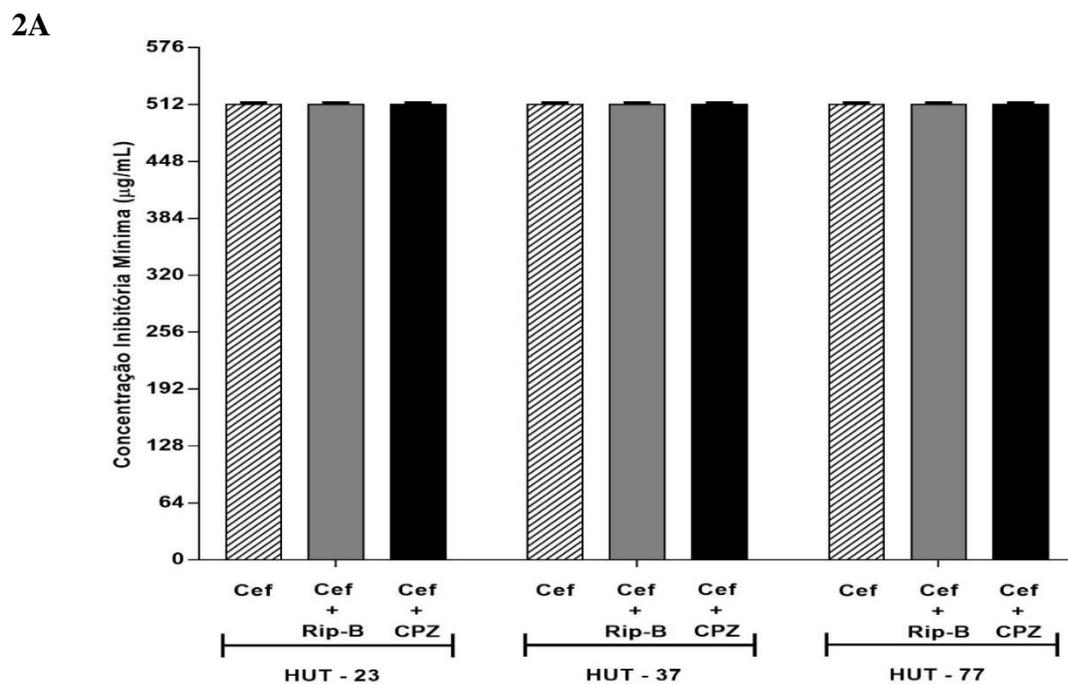
**Gráfico 1.** CIM da Amicacina (AMI) na ausência ou presença de Riparina B (Rip-B) ou Clorpromazina (CPZ) na concentração sub-inibitória para *A. baumannii* multirresistente. A) Cepas sem fenótipo de bomba de efluxo; B) Cepas com perfil fenotípico de bomba de efluxo. C) CIM do Brometo de etídio (BrEt) na ausência ou presença de RipB ou CPZ. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Da Paz Pereira *et al.* (2020) estudaram 23 isolados clínicos de *Acinetobacter* spp. de um hospital oncológico de Recife e verificaram que 12 cepas (52,2%) eram resistentes à gentamicina e amicacina, e identificados como *A. baumannii*. Entre estes, 11 (91,7%), apresentaram CIM > 256 µg / mL de amicacina. O referido estudo não avaliou a participação do sistema de efluxo, tendo identificado a presença do gene *ArmA* em 100% dos isolados.

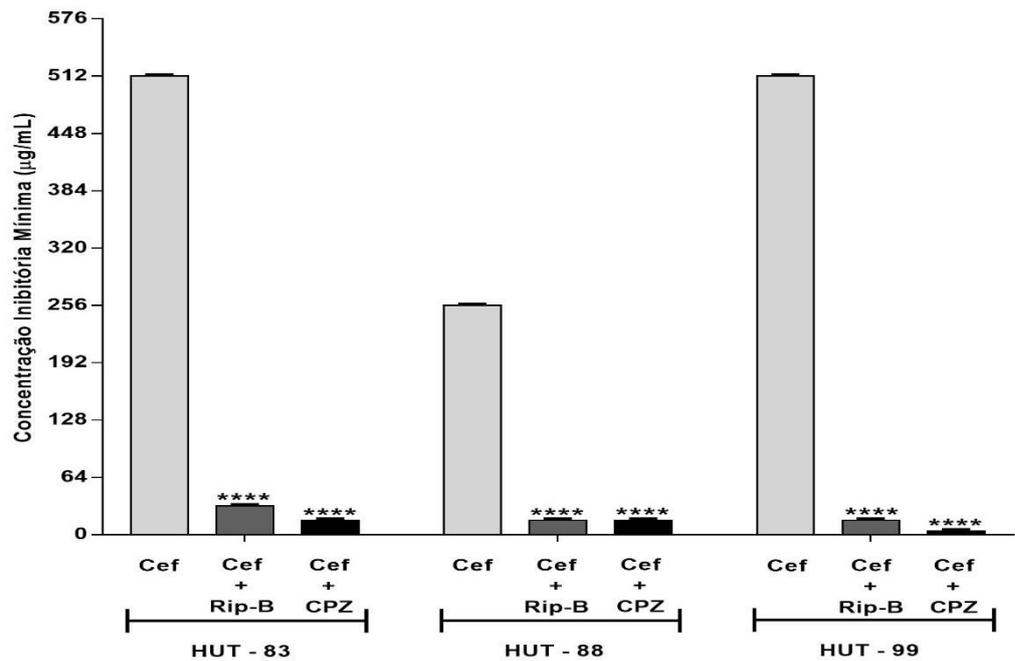
Outro estudo realizado por Alves (2017) também realizado em Recife e com pacientes oncológicos verificou 5 isolados de *A. baumannii*, sendo que todos os isolados foram resistentes à ceftriaxona (CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ ), ceftazidima (CIM  $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$ ), imipenem (CIM  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ), meropenem (CIM  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ) e ciprofloxacina (CIM  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ). A resistência à amicacina (CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ ) e gentamicina (CIM  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$ ) foi observada em 3 das 5 amostras. Análises do sequenciamento genômico dessas amostras mostrou, em todos os isolados, a presença de vários genes de sistemas de efluxo pertencentes as famílias MATE, RND e MFS (Alves, 2017).

## 5.2 Ceftazidima

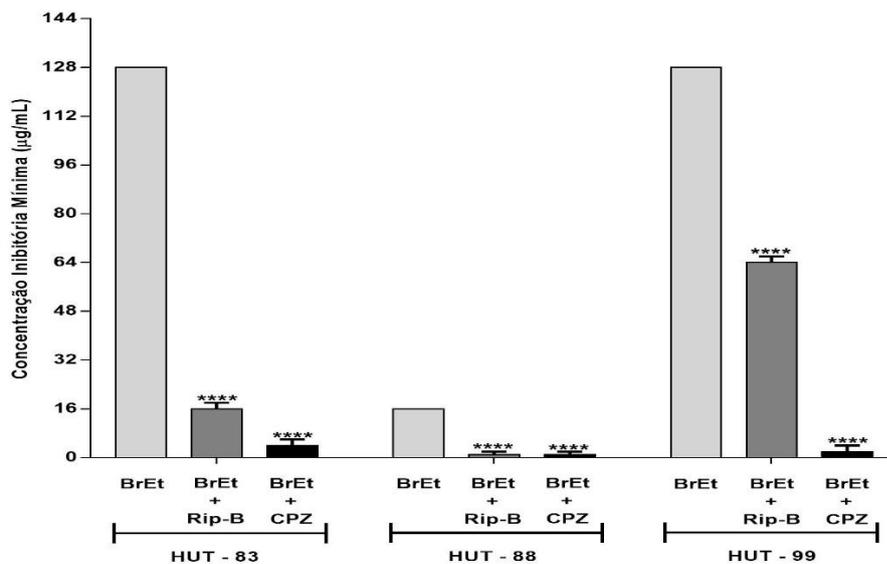
No gráfico 2 são demonstrados as CIM de ceftazidima na presença ou ausência de Riparina B e CPZ para cepas sem fenótipo de bomba de efluxo (2A) e com fenótipo de bomba de efluxo (2B) para esta droga. As cepas HUT 23, 37, 77 não mostraram diferenças significativas de CIM para ceftazidima em associação com Rip B ou CPZ, confirmando que estas cepas não possuem características fenotípicas de resistência por bomba de efluxo (2A). Os resultados da associação de RIP – B com brometo de etídio (2C) também sugerem que a Rip B apresenta forte ação moduladora da resistência para cepas que apresentam resistência por bomba de efluxo.



2B



2C



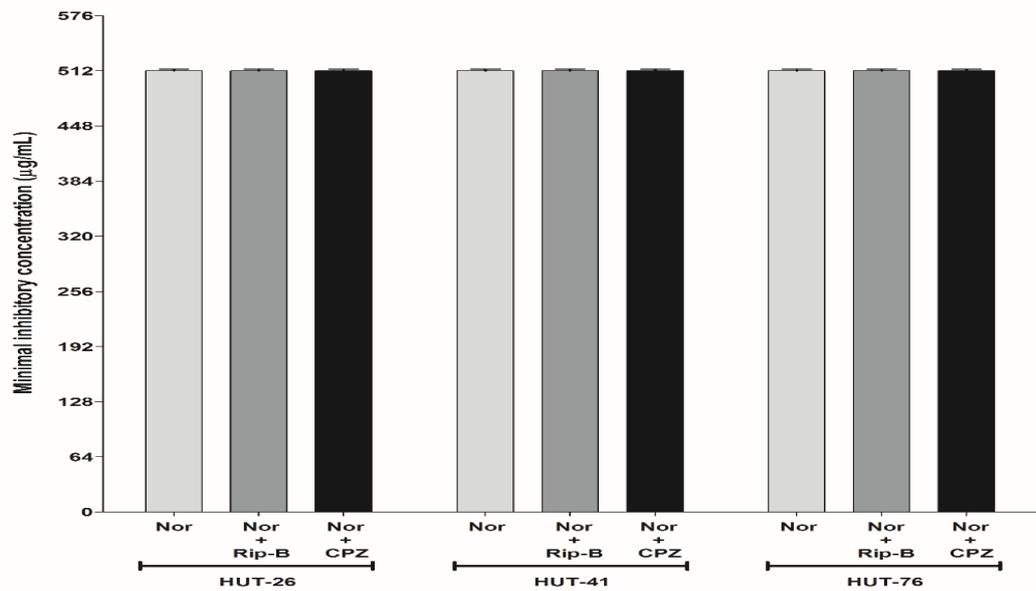
**Gráfico 2.** CIM da Cefazidima (CEF) na ausência ou presença de Riparina B (Rip-B) ou Clorpromazina (CPZ) na concentração sub-inibitória para *A. baumannii* multirresistente. A) Cepas sem fenótipo de bomba de efluxo; B) Cepas com perfil fenotípico de bomba de efluxo. C) CIM do Brometo de etídio (BrEt) na ausência ou presença de RipB ou CPZ. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Em um estudo realizado por Dias (2015), foi observado que 88,6% das cepas de *A. baumannii* resistentes a ceftazidima apresentaram gene para bomba de efluxo AdeB. Esta bomba de efluxo opera, quando super-expressa, de forma sinérgica com baixa permeabilidade de membrana, expulsando aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos e quinolonas, entre outros compostos.

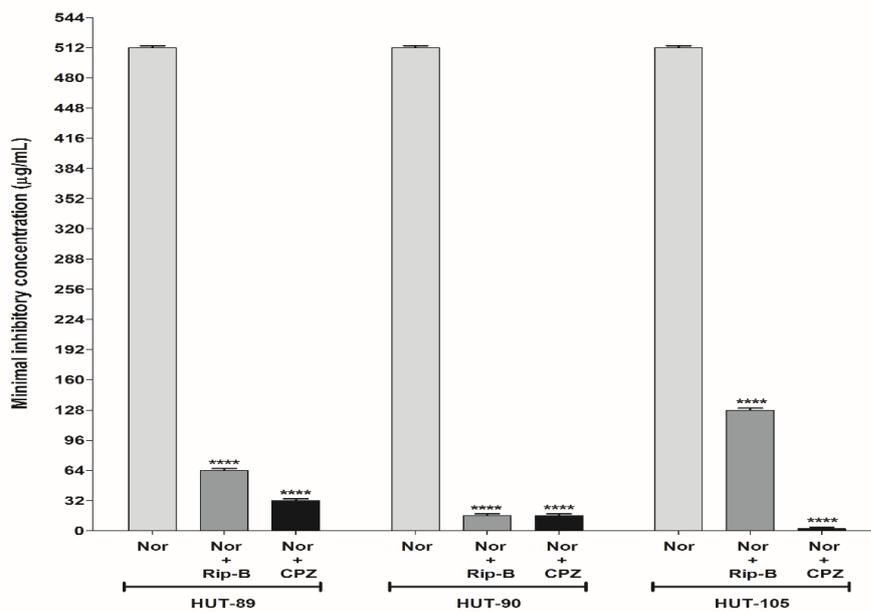
### 5.3 Norfloxacin

O gráfico-3 mostra atividade moduladora da resistência bacteriana de Rip-B combinada com Norfloxacin apenas nas cepas com fenótipo de bomba de efluxo (3B), não havendo diminuição da CIM nas cepas que não apresentam o fenótipo de bomba de efluxo (3A), de forma semelhante ao resultados obtidos com os outros antibióticos e confirmado no ensaio de associação com o Brometo de Etídio (3C).

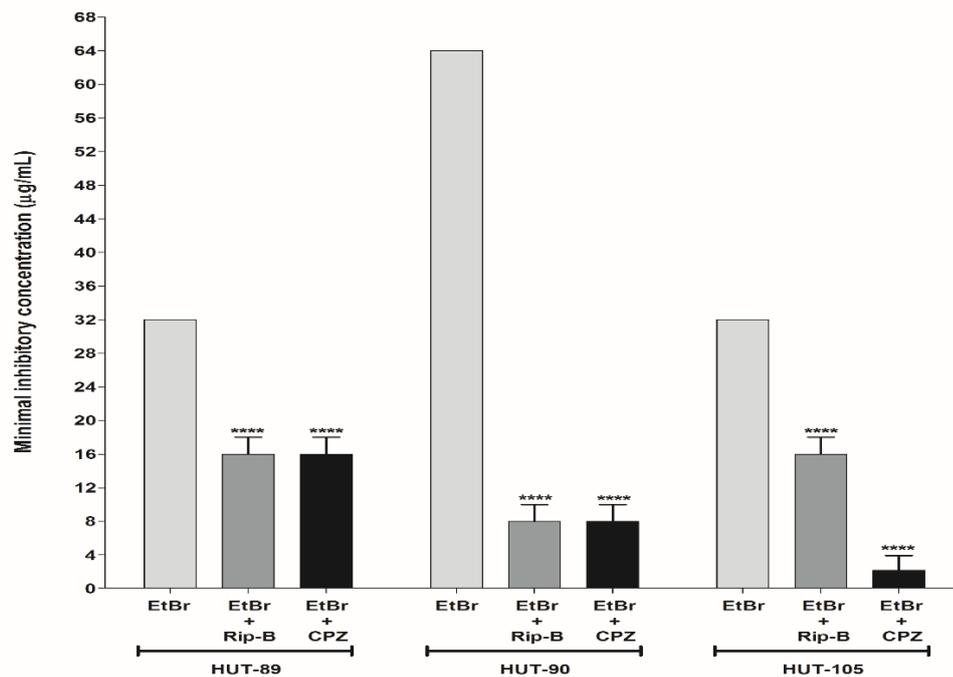
3A



3B



3C



**Gráfico 3.** CIM da Norfloxacina (NOR) na ausência ou presença de Riparina B (Rip-B) ou Clorpromazina (CPZ) na concentração sub-inibitória para *A. baumannii* multirresistente. A) Cepas sem fenótipo de bomba de efluxo; B) Cepas com perfil fenotípico de bomba de efluxo. C) CIM do Brometo de etídio (BrET) na ausência ou presença de RipB ou CPZ. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Estes resultados obtidos para os três antibióticos testados indicam que o Rip-B é um agente modulador da resistência a antimicrobianos em cepas de *A. baumannii*, atuando provavelmente como um inibidor de bombas de efluxo. Esta hipótese foi corroborada pelos resultados obtidos utilizando o CPZ, um conhecido inibidor de NorA (NEYFAKH *et al.*, 1993), que também modulou a resistência a antibióticos apenas nas cepas que expressam resistência mediada por bomba de efluxo.

O brometo de etídio (EtBr) é um corante genotóxico que se intercala na dupla hélice do DNA, causando danos ao DNA e morte celular, e o único mecanismo de resistência conhecido pelo EtBr nas bactérias é mediado por bomba de efluxo (MARKHAM *et al.*, 1999). Assim, esse agente intercalante tem sido utilizado como indicador da resistência mediada por bombas de efluxo (Ribeiro *et al.*, 2019).

De fato, um estudo anterior relatou que a Rip-B é um inibidor da *NorA*, uma próton-bomba de efluxo dependente da força motriz de *S. aureus*. Pertence ao Facilitador Principal Superfamília (MFS), capaz de competir com antibióticos pela mesma ligação formado por ILE19, ILE23, PHE26, PHE47, ALA48, GLN51, MET109, THR113, SER133, ILE136, THR211, ARG310, ILE313, THR314, ASN332, SER333, THR336, SER337, ASN340 e PHE341 (Costa *et al.*, 2016). *NorA* é capaz de extrudir hidrofílico de fluoroquinolonas, como

Norfloxacina e Ciprofloxacina, e outros biocidas como quaternários compostos de amônio e EtBr (SCHINDLER; KAATZ, 2016).

Em *A. baumannii*, resistência à amicacina, ceftazidima e norfloxacina podem ser mediada pelo mecanismo de bomba de efluxo a múltiplas drogas da família AdeABC (XU; BILYA; XU, 2019; LARI *et al.*, 2018; ZHU; WANG; ZHANG, 2017; CARDOSO *et al.*, 2016; ARDEBILI *et al.*, 2014; WAREHAN, 2010), entre outros mecanismos. A AdeABC também é uma bomba de efluxo próton-dependente e pertence à Divisão de Células de Resistência e Nodulação (RND). Altas frequências de superexpressão de AdeABC estava relacionado entre isolados clínicos de *A. baumannii* da França (YOON *et al.*, 2013) e Brasil (CARDOSO *et al.*, 2016).

As cepas multirresistentes que superexpressam as bombas de efluxo são capazes de extrudar antibióticos, reduzindo suas concentrações intracelulares. Assim, é possível que as cepas testados no presente estudo podem superexpressar o AdeABC ou outras bombas de efluxo que foram inibidas por Rip-B. Por sua vez, a inibição de bombas de efluxo pelo Rip-B poderia levar a uma maior acumulação de antibióticos no periplasma ou citoplasma, onde os alvos dos antibióticos estão localizados aprimorando sua atividade.

## 6 CONCLUSÃO

A combinação de antibióticos com inibidores de bombas de efluxo pode ser uma estratégia promissora para tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* multirresistentes. Resultados encontrados no presente estudo mostraram que o Rip-B era inativo contra *A. baumannii*. No entanto, o Rip-B foi capaz de melhorar a atividade da amicacina, ceftazidima e Norfloxacina contra essas cepas superexpressando resistência mediada por fenótipo de bomba de efluxo. Os resultados obtidos através dos ensaios de associação Rip-B / EtBr sugeriram que o aumento da atividade antibiótica provavelmente envolve a inibição de bombas de efluxo superexpressas nas estirpes testadas. Assim, o Rip-B pode ser aplicado como um adjuvante da Amicacina, Cefazidima e Norfloxacina no tratamento de infecções causadas por cepas multirresistente de *A. baumannii* que superexpressam bombas de efluxo.

## REFERÊNCIAS

- Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, et al. Resistance to Colistin in *Acinetobacter baumannii* Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System. **Antimicrob Agents Chemother.** 53(9):3628–34, 2009.
- ALMASAUDI, S. B. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2016.
- AGNIHOTRI S., WAKODE S., AGNIHOTRI A. An overview on antiinflammatory properties and chemo-profiles of plants used in traditional medicine. **Indian Journal of Natural Products and Resource**, v. 1, p.150-167, 2010.
- ANVISA. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Microbiologia Clínica para o controle da infecção relacionada à assistência em saúde. **ANVISA**, p. 1– 154, 2013.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Informativo: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Avaliação dos indicadores nacionais de infecção relacionada à assistência ano de 2014 e relatório de progresso. **ANVISA**, n. 11, Ano VI. 2015.
- ANVISA. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde no 16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016. **ANVISA**, v. 16, p. 83, 2016.
- AKERS, K. S. et al. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus complex. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1132–1138, abr. 2010.
- ARAÚJO, F. L. *et al.* Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (Riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, p. 337-344, 2009.
- ARDEBILI, A.; TALEBI, M.; AZIMI, L.; LARI, A.R. Effect of Efflux Pump Inhibitor Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone on the Minimum Inhibitory Concentration of Ciprofloxacin in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. **Jundishapur J Microbiol**, vol. 7, n. 1, p.86-91, 2014.
- ATROUNI, A. *et al.* Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, CA, v.52, p. 29- 36, 2016.
- BECEIRO A, LLOBET E, BENGOCHEA A, DOUMITH M, HORNSEY M, DHANJI H, CHART H, BOU G, LIVERMORE D, WOODFORD N. Phosphoethanolamine Modification of Lipid A in Colistin-Resistant Variants of *Acinetobacter baumannii* Mediated by the pmrAB Two-Component Regulatory System. **Antimicrob Agents Chemother.** 55(7):3370–9, 2011.
- BARBOSA-FILHO, J.M. *et al.* Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, Reino Unido, vol. 26; no. 9; p. 2615-2617; 1987.

BAY, D. C.; ROMMENS, K. L.; TURNER, R. J. Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. **Biochim. Biophys. Acta**, vol. 1778, p. 1814–1838, 2008.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 13, p. 42–51, 2015.

BLANCO P, HERNANDO-AMADO S, REALES-CALDERON JA, CORONA F, LIRA F, ALCALDE-RICO M, BERNARDINI A, SANCHEZ MB, MARTINEZ JL. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. **Microorganisms**, vol. 4, n. 14, 2016.

BRILL, S.; SADE-FALK, O.; ELBAZ-ALON, Y.; SCHULDINER, S. Specificity determinants in small multidrug transporters. **J. Mol. Biol.**, vol. 427, p. 468–477, 2015.

BROSSARD, K.A.; CAMPAGNARI, A.A. The *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein Plays a Role in Adherence to Human Epithelial Cells Infect Immun. **Infect Immun**, v. 80, n. 1, p. 228–233, 2012.

CAI Y, CHAI D, WANG R, LIANG B, BAI N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. **J Antimicrob Chemother.** 67(3):1607–15, 2012.

CAMARENA, L., BRUNO, V., EUSKIRCHEN, G., POGGIO, S., AND SNYDER, M. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNAsequencing. **PLoS Pathog.** 6:e1000834, 2010. doi: 10.1371/journal.ppat.1000834

CARDOSO, J.P.; CAYÔ, R.; GIRARDELLO, R.; GALES, A.C. Diversity of mechanisms conferring resistance to  $\beta$ -lactams among OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* clones. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol. 85, p. 90–97, 2016.

CARVALHO, A.M.R. Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da Riparina II (O-METIL-N-2-HIDROXI-BENZOIL-TIRAMINA) em modelos experimentais. **Dissertação de Mestrado**, 2011.

CASTELO-BRANCO, U. V.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; THOMAS, G.; DE ARAÚJO, C. C.; BARBOSAFILHO, J. M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Nees) mez (Lauraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 197–202, 2000.

CATAO, R. M. R. ; BARBOSA-FILHO, J.M. ; GUTIERREZ, Stanley Juan Chavez ; Lima, Edeltrudes de Oliveira ; PEREIRA, M. S. V. ; ARRUDA, T. A. ; ANTUNES, R. M. P. . Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, p. 247-249, 2005.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. D. O.; PEREIRA, M. do S. V.; ARRUDA, T. A.; MIRANDA, R. P. A. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos

biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 42, n. 1, p. 9–14, 2010.

CHANG, G.; SZEWCZYK, P.; HE, X. Structures of Multidrug Efflux Pumps from the MFS, SMR, MATE and ABC Transporter Families. **Microbial Efflux Pumps: Current Research**, vol, 21, p. 886-887, 2013.

CHEN, W. Current advances and challenges in the development of *Acinetobacter* vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, Austin, US, v.11, p. 2495— 2500, 2015.

CHO, Y.; OH, Y.; PARK, S.; LEE, Y. Concentration of CCCP should be optimized to detect the efflux system in quinolone-susceptible *Escherichia coli*. **The Journal of Microbiology**, v.39, p. 62-66, 2001.

CHOI, C. H., LEE, E. Y., LEE, Y. C., PARK, T. I., KIM, H. J., HYUN, S. H., et al. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol.* 7, 1127–1138, 2005. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x

CHOI, C. H. et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 309-19, 2008a.

Choi, C. H., Lee, J. S., Lee, Y. C., Park, T. I., and Lee, J. C. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol.* 8:216, 2008b. doi: 10.1186/1471-2180-8-216.

CHOUDHURY, H. G. et al. Structure of an antibacterial peptide ATP- binding cassette transporter in a novel outward occluded state. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, vol. 111, p. 9145–9150, 2014.

CHUSRI, S.; CHONGSUVIVATWONG, V.; RIVERA, J.I.; SILPAPOJAKUL, K.; SINGKHAMANAN, K.; MCNEIL, E.; DOI, Y. Clinical outcomes of hospital-acquired infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. **Antimicrob Agents Chemother**, vol. 58, p. 4172– 4179, 2014.

CLSI, **Clinical and Laboratory Standards Institute** (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI Document M100-S23. Wayne, PA: CLSI.

COELHO, J.; et al. Occurrence of OXA-58-like carbapenemases in *Acinetobacter* spp. collected over 10 years in three continents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 50, p. 756-8, 2006.

COSTA, A.C.; SANTOS, B.H.C.; SANTOS FILHO, L.; LIMA, E.O. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, vol. 19, p. 236-241, 2009.

COSTA, L. M. Investigação de atividades biológicas das riparinas A, B, C, D, E e F: Citotoxicidade, atividade antioxidante e potencial antiesquistossoma. 2013, 60p. **Trabalho de**

**conclusão de curso (Monografia) – Curso de Farmácia, Universidade Federal do Piauí, Teresina.**

COSTA, L. M.; DE MACEDO, E. V.; OLIVEIRA, F. A. A.; FERREIRA, J. H. L.; GUTIERREZ, S. J. C.; PELÁEZ, W. J.; LIMA, F. C. A.; DE SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; KAATZ, G. W.; DE FREITAS, R. M. e BARRETO, H. M. Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 1312-1322, 2016.

COURVALIN, P.; PE, B. MINIREVIEW Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 947– 953, 2011.

CRONQUIST, A. A Evolução e Classificação de Plantas Florescentes. **Jardim Botânico de Nova York**, Bronx, 1988.

CUSTODIO, D. L.; DA VEIGA JUNIOR, V. F. Lauraceae alkaloids. **RSC Advances**, v. 4, n. 42, p. 21864-21890, 2014.

DASTVAN, R.; FISCHER, A. W.; MISHRA, S.; MEILER, J.; MCHAOURAB, H. S. Protonation- dependente conformational dynamics of the multidrug transporter EmrE. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, vol. 113, p. 1220–1225, 2016.

DA PAZ, P; JUSSYEGLES, N.; DE ANDRADE, C.A.N; DA COSTA, J.L.L; DE LIMA, R.G.; DE ARAUJO, P.S.R; MACIEL, M.A.V. Clonal Dissemination of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Carriers of 16S rRNA Methylase Genes in an Oncological Hospital in Recife, Brazil. **Curr Microbiol ; 77(1): 32-39, 2020 Jan.**

DE BREIJ, A. *et al.* CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. **Res Microbiol**, v. 160, n. 3, p. 213-8, Abr 2009.

DE BREIJ, A. *et al.* Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? **PloS one**, vol. 5, 2010.

DE CARVALHO, A. M. R.; ROCHA, N. F. M.; VASCONCELOS, L. F.; RIOS, E. R. V.; DIAS, M. L.; SILVA, M. I. G.; DE FRANÇA FONTELES, M. M.; FILHO, J. M. B.; GUTIERREZ, S. J. C.; DE SOUSA, F. C. F. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chemico-Biological Interactions**, v. 205, n. 3, p. 165–172, 2013.

DE MELO, C. T. V.; DE CARVALHO, A. M. R.; MOURA, B. A.; TEIXEIRA, C. P. L.; VASCONCELOS, L. F.; FEITOSA, M. L.; DE OLIVEIRA, G. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CHAVEZ GUTIERREZ, S. J.; DE FRANÇA FONTELES, M. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; DE SOUSA, F. C. F. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 104–112, 2013.

DIAS, M.L. Atividade antinociceptiva da Riparina IV: participação dos receptores TRPV1, TRPM8, receptores glutaminérgicos e do óxido nítrico. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Ceará. 2012.

DIAS, V.C. Resistência aos Carbapenêmicos e Virulência de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* Isolados de um Serviço de Saúde Terciário. 2015, 118 p. **Tese de Doutorado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG.**

DJERIBI, R. et al. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. **Am J Infect Control**, v. 40, n. 9, p. 854-9, 2012.

EUZÉBY, J. P. Classification of domains and phyla – hierarchical classification of prokaryotes. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature: 2014a**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/~classifphyla.html#Proteobacteria>. Acesso em: 20 de setembro de 2019.

ÉVORA, BHSR. Susceptibilidade aos Antibióticos e aos Biocidas Clorexidina e Cloreto de Benzalcônio em Isolados Clínicos de *Acinetobacter baumannii*. 2019, 88p. **Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.**

FALAGAS ME, VARDAKAS KZ, KAPASKELIS A, TRIARIDES NA, ROUSSOS NS. Tetracyclines for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Int J Antimicrob Agents**. 45(5):455–60, 2015.

FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; TOMÁS-CARMONA, M.; CABALLERO-MOYANO, F.; BOU, G.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; VILA, J.; PACHÓN, J.; CISNEROS, J. M.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; PASCUAL, A. *In vitro* activity of 18 antimicrobial agents against clinical isolates of *Acinetobacter* spp. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 31, n. 1, p. 4-9, 2013.

FIGUEIREDO, S.; POIREL, L.; PAPA, A; KOULOURIDA, V.; NORDMANN, P. Overexpression of the naturally occurring blaOXA-51 gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAb9. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.9, p.4045-4047, 2009.

FISHBAIN, J.; PELEG, A.Y. Treatment of *Acinetobacter* infections. **Clin Infect Dis**. v. 51, n. 1, p. 79-84, 2010.

FLORES-DIAZ, M., MONTURIOL-GROSS, L., NAYLOR, C., ALAPE-GIRON, A., AND FLIEGER, A. Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 80, 597–62. 2016. doi: 10.1128/MMBR.00082-15

GADDY, J. A., TOMARAS, A. P., AND ACTIS, L. A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. **Infect. Immun.** 77, 3150–3160, 2009. doi: 10.1128/IAI.00096-09

GADDY, J. A., ARIVETT, B. A., MCCONNELL, M. J., LOPEZ-ROJAS, R., PACHON, J., AND ACTIS, L. A. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. **Infect. Immun.** 80, 1015–1024, 2012. doi: 10.1128/IAI.06279-11

GALES, A. C. *et al.* The Worldwide Panorama of *Acinetobacter baumannii* Group and *Stenotrophomonas maltophilia* in the Last 20 Years: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997 – 2016). **ECCMID**, p. 2018, 2018.

GAYEN, A.; LENINGER, M.; TRAASETH, N. J. Protonation of a glutamate residue modulates the dynamics of the drug transporter EmrE. **Nat. Chem. Biol**, vol. 12, p. 141, 2016.

GIRAUD, E.; CLOECKAERT, A.; KERBOEUF, D.; CHASLUS-DANCLA, E. Evidence for active efflux as primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.1223-1228, 2000.

Goldstein BP. Resistance to rifampicin: a review. **J Antibiot**. Tokyo: 67(9):625–30, 2014.

GORDON, N.C.; WAREHAM, D.W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **Int J Antimicrob Agents**, vol. 35, p. 219 –226, 2010.

GOVINDAN RAJAMOCHAN, V. B. S. AND W. A. G. Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides in mediating decreased susceptibility to biocides. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. December, p. 228–232, 2009.

GUTIERREZ, S.J.C. *et al.* N-Benzoyltryptamine derivatives with relaxant activity in guinea-pig ileum. **II Farmaco (Pavia)**, v. 60, p. 475-477, 2005.

GUTIERREZ, S.J.C. Síntese do Bowdenol, um Dihidrobenzofuranoide Isolado de Bowdichia Virgilioides e Preparação de Derivados da Riparina Isolada de Aniba Riparia com Potencial Atividade Biológica. **Ph.D. Thesis, UFPB/CCS: João Pessoa, Brazil, 2007.**

HAMOUDA, A.; AMYES, S. G. B. Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin Susceptibility of capsular *Staphylococcus aureus* strains to some antibiotics, **triclosan and cationic biocides**. n. 2001, p. 695–696, 2004.

HARDING, C. M. *et al.* *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. **MBio**, v. 6, n. 4, 2013.

HOMENTA, H. *et al.* The 38.8 kDa Pili Subunit Hemagglutinin Protein of *Acinetobacter baumannii* is an Adhesin Protein that can activate s-IgA Production. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, vol. 9, n.1, p. 26-33, 2014.

HOOD, M.I.; JACOBS, A.C.; SAYOOD, K.; DUNMAN, P.M.; SKAAR, E.P. *Acinetobacter baumannii* Increases Tolerance to Antibiotics in Response to Monovalent Cations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol, 54, p. 1029-1041, 2010.

JACOBS, A. C., HOOD, I., BOYD, K. L., OLSON, P. D., MORRISON, J. M., CARSON, S., *et al.* Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. **Infect. Immun.** 78, 1952–1962, 2010. doi: 10.1128/IAI.00889-09

JACOBS, A. C. Characterizing *Acinetobacter baumannii* virulence factors. 2011. 170 f. **Tese (Doutorado) - Curso de Pathology And Microbiology, University Of Nebraska Medical Center, Omaha, 2011.**

JAWAD, A. et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 7, p.1938-1941, 1998.

JEAN, S. S. *et. al.* Carbapenem susceptibilities and non-susceptibility concordance to different carbapenems amongst clinically important Gram-negative bacteria isolated from intensive care units in Taiwan: Results from the Surveillance of Multicentre Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART) in 2009. **Int J of Antimicrob Agents** v. 41, n. 5, p.4 57-62, 2013.

JEON, J. H., LEE, J. H., LEE, J. J., PARK, K. S., KARIM, A. M., LEE, C. R., et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. **Int. J. Mol. Sci.** 16, 9654–9692, 2015.doi: 10.3390/ijms16059654

JOLY-GUILLOU, M. L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, US, v.11, p. 868–873, 2005.

KENYON, J. J., HALL, R. M. Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e62160, 2013.

KIM, S. W., CHOI, C. H., MOON, D. C., JIN, J. S., LEE, J. H., SHIN, J. H., ET AL. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. **FEMS Microbiol. Lett.** 301, 224–231, 2009. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01820.x

KINSELLA, R. L.; SCOTT, N. E.; FELDMAN, M. F. Clinical implications of glycoproteomics for *Acinetobacter baumannii*. **Expert Rev Proteomics**, v. 12, n. 1, p. 1-3, 2015.

KONEMAN, E. W. *et al.* Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido 6. **Ed. Rio de Janeiro: GEN/Guanabara Koogan Editora, 2012.**

KROGER, C.; STEFANI C. Kary, SCHAUER K, CAMERON A D. S. Genetic Regulation of Virulence and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Genes**, 8, 12. 2017.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H.P. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol.57, p.1486-1513, 2005.

LARI, A.R.; ARDEBILI, A.; HASHEMI, A. AdeR-AdeS mutations & overexpression of the AdeABC efflux system in ciprofloxacin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Indian J Med Res**, vol. 147, p 413-421, 2018.

LEE, H.W.; KOH, Y.M.; LEE, J.C.; LEE, Y.C.; SEOL, S.Y.; CHO, D.T.; KIM, J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, n.1, p.49-54, 2008.

LEE, J. S., CHOI, C. H., KIM, J. W., AND LEE, J. C. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces dendritic cell death through mitochondrial targeting. *J. Microbiol.* 48, 387–392, 2010. doi: 10.1007/s12275-010-0155-1

LEE, C.R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. March, 2017.

LI, L; HASSAN K.A.; BROWN M.H.; PAULSEN I.T. Rapid multiplexed phenotypic screening identifies drug resistance functions for three novel efflux pumps in *Acinetobacter baumannii*, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Volume 71, Issue 5, May 2016, Pages 1223–1232, <https://doi.org/10.1093/jac/dkv460>

LI, X.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 28, n. 2, p. 337–418, 2015.

LIN, M. et al. Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii* adeAB genes and its correlation with tigecycline susceptibility. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014.

LIN, M. F.; LIN, Y. Y.; TU, C. C.; LAN, C. Y. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Hong Kong, CN, p. 1-8, 2015.

LIN, M.F.; LIN, Y.Y.; TU, C.C.; LAN, C.Y. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. **J Microbiol Immunol Infect**, vol. 50, p. 224–231, 2017.

LYTVYNENKO, I.; BRILL, S.; OSWALD, C.; POS, K. M. Molecular basis of polyspecificity of the small multidrug resistance efflux pump AbeS from *Acinetobacter baumannii*. **J. Mol. Biol**, vol. 428, p. 644–657, 2016.

LOCHER, K.P. Mechanistic Diversity in ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. **Nature Structural & Molecular Biology**, 23, 487-494, 2016.

LONGO, F.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbiologica**, Pavia, IT, v.37, p.119-127, 2014.

LÓPEZ-CAMACHO, E. *et al.* Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 632-636, 2014.

LÓPEZ, M., *et al.* Genome Sequence of a Clinical Strain of *Acinetobacter baumannii* Belonging to the ST79/PFGE-HUI-1 Clone Lacking the AdeABC (Resistance-Nodulation-Cell Division-Type) Efflux Pump. **Genome Announcement**, 4, e00962-e00916, 2016.

MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. **Antimicrob Agents Chemother**, vol. 45, p. 3375–3380, 2001.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, vol. 8, no.1, p.195, 2001.

MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J.; OLIVEIRA, E. et al. Proteomic analysis of a fraction enriched in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*. **Proteomics**, vol. 6, p. 82–87, 2006.

MARTINEZ A.; LIN J. Effect of an efflux pump inhibitor on the function of the multidrug efflux pump CmeABC and antimicrobial resistance in *Campylobacter*. **Foodborne Pathog Dis** 3: 393-402, 2006.

MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. *Acinetobacter* multirresistente – um desafio para a saúde pública. **Sci Med**, vol. 23, p. 56-62, 2013.

MCCONNELL MJ, ACTIS L, PACHÓN J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS microbiology reviews**. 2013 Mar 1;37(2):130-55.

MEDEIROS, I. G. F. Resistência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em um hospital municipal na cidade de Uberlândia/MG. 2017. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado) - **Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2017.

MEGEED, A. A., HAYSSAM, M. A., SALEM, M. Z., EL-SHIKH, M. S., TALEA, I. A., AND ALOGAIBI, Y. A. Investigation of the virulence factors and molecular characterization of the clonal relations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. **J. AOAC**, 2016. Int. doi: 10.5740/jaoacint.16-0139. [Epub ahead of print]

MELO, C. T. V. Estudo dos Efeitos Farmacológicos de (O-Metil)-N-2,6-dihidroxi-benzil tiramina (Riparina III) de *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) em Modelos Comportamentais de Ansiedade e Depressão em Camundongos. 2006, 156 p. **Dissertação de Mestrado. Programa de Pós - graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.**

MELO, M.S.; SANTOS, M.C.; COSTA, J.G.; PIRES, L.L.S.; ROCHA, T.J.M.; SANTOS, A.F. Caracterização fitoquímica de *Clitoria ternatea* Linn biodirecionada pelo seu potencial contra micro-organismos multirresistentes. **Diversitas Journal**, vol 3, n. 2, p.429-441, 2018.

MONTEFOUR, K. et al. *Acinetobacter baumannii*: Na Emerging Multidrug-Resistant Pathogen in critical care. **Critical care nurse**, v.28, p. 15-25,2008.

MORRISON, E. A. et al. Antiparallel EmrE exports drugs by exchanging between asymmetric structures. **Nature**, vol. 481, n. 45, 2012.

NEONAKIS, I. K.; SPANDIDOS, D. A.; PETINAKI, E. Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam - US, v.37, p. 102-109, 2011.

NI, W.; LI, Y.; GUAN, J.; ZHAO, J.; CUI, J.; WANG, R.; LIU, Y. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant gram-negative bacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, vol. 60, p. 3215-3218, 2016.

NIKAIDO, H.; PAGÈS, J.M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Ver**, vol. 36, p. 340–363, 2012.

NOWAK, J.; SEIFERT, H.; HIGGINS, P. G. Prevalence of eight resistance-nodulation-division efflux pump genes in epidemiologically characterized *Acinetobacter baumannii* of worldwide origin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 630–635, 2015.

NUNES, G. B. L.; POLICARPO, P. R.; COSTA, L. M.; DA SILVA, T G.; MILITÃO, C, G. G.; CÂMARA, C. A.; BARBOSA FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; ISLAM, M. T.; DE FREITAS, R. M. *In vitro* antioxidant and citotoxic activity of some synthetic riparin-derived compounds. **Molecules**, vol. 19, p. 4595-4607, 2014.

OLIVEIRA, I.C.M. Efeitos centrais da Riparina I de Aniba riparina (Ness) Mez Lauraceae em modelos comportamentais de ansiedade, depressão, sono e convulsão em camundongos. **Dissertação de Mestrado**, 2012.

PAGÈS, J.M.; MASI, M.; BARBE, J. Inhibitors of efflux pumps in gram-negative bacteria. **TRENDS in Molecular Medicine**, vol.11, p.382-389, 2005.

PAPP-WALLACE, K. M. *et al.* Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 55, n.11, p.4943-60, 2011.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **ClinMicrobiol Rev**. vol. 21, n. 3, p. 538-582, 2008.

PELEG, A. Y., ADAMS, J., AND PATERSON, D. L. Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother**. 51, 2065–2069, 2007. doi: 10.1128/AAC.01198-06

PENWELL, W. F.; ARIVETT, B. A.; ACTIS, L. A. The *Acinetobacter baumannii* entA Gene Located Outside the Acinetobactin Cluster Is Critical for Siderophore Production, Iron Acquisition and Virulence. **Plos One**, São Francisco, US, v. 7, n.5, e36493, 2012.

PENWELL, W.F. *et al.* Molecular Mechanisms of Sulbactam Antibacterial Activity and Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 59, 1680-1689, 2015.

PÉREZ-VARELA, M.; CORRAL, J.; VALLEJO, J.A.; RUMBO-FEAL, S.; BOU, G.; ARANDA, J.; BARBÉ, J. Mutations in the  $\sigma$ -subunit of the RNA polymerase impair the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii*. **Infect Immun**, vol. 85, 2017.

PÉREZ-VARELA, M.; CORRAL, J.; ARANDA, J.; BARBÉ, J. Functional characterization of AbaQ, a novel efflux pump mediating quinolone resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, vol. 62, n. 9, 2018.

RADESTOCK, S.; FORREST, L. R. The alternating- access mechanism of MFS transporters arises from inverted topology repeats. **J. Mol. Biol.**, vol. 407, p. 698–715, 2011.

RAJAMOCHAN G.; SRINIVASAN V.B.; GEBREYES W.A. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemother.** v. 65, p. 1919-1925, 2010.

RAMIREZ, M. S., DON, M., MERKIER, A. K., BISTUE, A. J., ZORREGUIETA, A., CENTRON, D., et al. Naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate as a convenient model for genetic studies. **J. Clin. Microbiol.** 48, 1488–1490, 2010a. doi: 10.1128/JCM.01264-09

ROBERTS S.A., FINDLAY R., LANG S.D. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. **The Journal of hospital infection**, 48, 228-232, 2001.

RUMBO, C., TOMAS, M., FERNANDEZ MOREIRA, E., SOARES, N. C., CARVAJAL, M., SANTILLANA, E., et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33- 36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect. Immun.* 82, 4666–4680, 2014. doi: 10.1128/IAI. 02034-14

SADER, H.S.; MENDES, R.E.; GALES, A.C.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A.; ZOCCOLI, C.; SAMPAIO, J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros – Resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **J Pneumol**, vol. 27, n. 2, 2001.

SANTIAGO, R.F. et al. Riparin B, a Synthetic Compound Analogue of Riparin, Inhibits the Systemic Inflammatory Response and Oxidative Stress in Mice. **Inflammation**, v. 38, n. 6, p.2203-2215, 2015.

SEIXAS, S. R. S. Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiopressora. 1996. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SELASI, G.N; NICHOLAS, A.; JEON, H.; NA, S.H; KWON, H.II; KIM, Y.J; HEO, S.T; OH, M.H; LEE, J.C. Differences in biofilm mass, expression of biofilm-associated genes, and resistance to desiccation between epidemic and sporadic clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* sequence type. **PLoS One** 11(9):e0162576

SIMÕES, A.S.M. Contribuição do efluxo para aquisição de resistência ao antibióticos em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*. Mestrado - Programa de Ensino e Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT/UNL). **Universidade Nova de Lisboa**, 2016.

SHAH, P. M.; ISAACS, R. D. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. **J Antimicrob Chemother.** v. 52, n. 4, p. 538–542, 2003.

SHARMA, A.; SHARMA, R.; BHATTACHARYYA, T.; BHANDO, T.; PATHANIA, R. Fosfomycin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major

facilitator superfamily (MFS) transporter—AbaF. **J Antimicrob Chemother**, vol. 72, p. 68–74, 2017.

SMANI, Y., MCCONNELL, M. J., AND PACHON, J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. **PLoS ONE** 7:e33073, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0033073.

SMANI, Y., DOMINGUEZ-HERRERA, J., AND PACHON, J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. **J. Infect. Dis.** 208, 1561–1570, 2013. doi: 10.1093/infdis/jit386

SMITH, S. G., MAHON, V., LAMBERT, M. A., AND FAGAN, R. P. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 273, 1–11, 2007. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00778.x

SNITKIN ES, ZELAZNY AM, GUPTA J, Comparative PS, Palmore TN, Murray PR, Segre J. Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment. **Genome Res.** 1155–62, 2013.

SOHAIL, M. et al. Major Article Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* clinical isolates and emerging antibiogram trends for nosocomial infection management. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. May, p. 300–304, 2016.

SOUSA, F.C.F.; LEITE, C.P.; MELO, C.T.V.; ARAÚJO, F.L.O.; GUTIERREZ, S.J.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FONTENELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B. Evaluation of effects of N(2-hydroxybenzoyl)tyramine (Riparin II) from *Aniba riparia* (Nees) Mez Lauraceae in Anxiety models em mice. **Pharmacology Biochemical Be.** Vol. 78, p. 27-33, 2004.

SOUSA et al. Evaluation of Effects of N-(2-Hydroxybenzoyl) Tyramine (Riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in Anxiety Models in Mice. **Biol. Pharm. Bull.** v.30, n. 7, p 1212-1216, 2007.

STAHL, J., BERGMANN, H., GOTTIG, S., EBERSBERGER, I., AND AVERHOFF, B. *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. **PLoS ONE** 10:e0138360, 2015. doi: 10.1371/journal.pone. 0138360

STROMMINGER, B. et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* towards increasing resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 616-622, 2014.

SU, X.Z.; CHEN, J.; MIZUSHIMA, T.; et al. AbeM, an H<sub>p</sub>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. **Antimicrob Agents Chemother**, vol. 49, p. 4362–4364, 2005.

TEIXEIRA, C. P. L.; DE MELO, C. T. V.; DE ARAÚJO, F. L. O.; DE CARVALHO, A. M. R.; SILVA, M. I. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MACÊDO, D. S.; DE BARROS VIANA, G. S.; DE SOUSA, F. C. F. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 129–137, 2013.

TEMGOUA, F.T.D.; WU, L. Mechanisms Efflux Pumps of *Acinetobacter baumannii* (MDR): Increasing Resistance to Antibiotics. **Journal of Biosciences and Medicines**, vol. 7, p. 48-70, 2019.

TORRES et al. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica atual y nuevas perspectivas. **Rev. Esp. Quimioter.**, v. 23, n. 1, p. 12-19, 2010.

TOUCHON, M., CURY, J., YOON, E. J., KRIZOVA, L., CERQUEIRA, G. C., MURPHY, C., et al. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biol. Evol.* 6, 2866–2882, 2014. doi: 10.1093/gbe/evu225

TOWNER, K.J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. **J Hosp Infect**, v. 73, n. 4, p. 355-63, 2009.

TRAGLIA, G. M., CHUA, K., CENTRON, D., TOLMASKY, M. E., AND RAMIREZ, M. S. Whole-genome sequence analysis of the naturally competent *Acinetobacter baumannii* clinical isolate A118. **Genome Biol. Evol.** 6, 2235–2239, 2014. doi: 10.1093/gbe/evu176

VANEGAS-MÚNERA, J.M.; RONCANCIO-VILLAMIL, G.; JIMÉNEZ-QUICENO, J.N. *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. **Rev CES Med**, vol. 28, n. 2, p. 233-246, 2014.

VERHALEN, B. et al. Energy transduction and alternating access of the mammalian ABC transporter P-glycoprotein. **Nature**, vol. 543, p. 738–741, 2017.

VICENTINI, A. et al. Lauraceae. In: Flora da Reserva Ducke – Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Edited by RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C., SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. Manaus: **INPA – DFID**, v. 1, p. 150-179, 1999.

VIEIRA, P.B.; PICOLI, S.U. *Acinetobacter baumannii* Multirresistente: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Clinical and Epidemiological Aspects. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, vol. 19, p. 151-156, 2015.

VILA, J. et al. **Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii***. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 39, n. 6, p. 757–762, jun. 1997.

VILA, J.; MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 59, p. 1210–1215, 2007.

VILA, J.; PACHÓN, J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: na update. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.13, p. 2319-2336, 2012.

WEBER, B. S.; HARDING, C. M.; FELDMAN, M. F. Pathogenic *Acinetobacter*: from the Cell Surface to Infinity and Beyond. **Journal of Bacteriology**, Washington, US, v.198, p. 880-887, 2016.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 51, n. 1, p. 9–11, 2003.

WERKMAN C, et al. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). **Revista Brasileira de Medicina**, v. 10, p.104-111, 2008.

WRIGHT, G.D. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Chemical Communications**, vol. 47, p. 4055-4061, 2011.

XU C.; BILYA, S. R.; XU, W. adeABC efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbes and New Infections**, vol. 30, n. C, 2019.

YONEHARA, R., YAMASHITA, E. e NAKAGAWA, A. Crystal Structures of OprN and OprJ, Outer Membrane Factors of Multidrug Tripartite Efflux Pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 84, 759-769, 2016.

YOON, E.J.; COURVALIN, P.; GRILLOT-COURVALINA, C. RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: major role for AdeABC overexpression and AdeRS mutations. **Antimicrob Agents Chemother**:57(7):2989-95, 2013.

YOON, E.J.; CHABANE, Y.N.; GOUSSARD, S.; SNESRUD, E.; COURVALIN, P.; DÉ, E.; GRILLOT-COURVALINA, C. Contribution of Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Systems to Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*. **mBio**, vol. 6, n. 2, 2015.

ZAFALON, L.F.; FILHO, N.A.; OLIVEIRA, J.V.; REZENDE, F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.577-585, 2007.

ZARRILLI, R. et al. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. **Int J Antimicrob Agents**, v. 41, n.1, p. 11-19, 2013.

ZAVASCKI, A.P.; CARVALHAES, C.G.; PICAPO, R.C.; GALES, A.C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Rev Anti Infect Ther**, vol.8, n. 1, p.71-93. 2010.

ZHAO, S.Y., JIANG, D.Y., XU, P.C., ZHANG, Y.K., SHI, H.F., CAO, H.L. e WU, Q. An Investigation of Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections in a Comprehensive Hospital of East China. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 14, 7, 2015.

ZHU, W.; WANG, H.; ZHANG, J.P. A comparison of adeB gene expression levels under conditions of induced resistance by different drugs in vitro in *Acinetobacter baumannii*. **Exp Ther Med**, vol. 13, p. 2177-2182, 2017.

ZOU, L., MENG, J., MCDERMOTT, P.F., WANG, F., YANG, Q., CAO, G., HOFFMANN, M. e ZHAO, S. Presence of Disinfectant Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Retail Meats in the USA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 69, p. 2644-2649, 2014.

## ANEXOS

**Modulation of the resistance to Norfloxacin by Riparin B in multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii***

Patrícia Virna Sales Leão<sup>a</sup>, Ana Laura da Silva Ferreira<sup>a</sup>, Felipe Araújo de Alcântara Oliveira<sup>a</sup>, Avilnete Belem de Souza Mesquita<sup>a</sup>, Stanley Juan Chavéz Gutierrez<sup>b</sup>, Humberto Medeiros Barreto<sup>a\*</sup> and Josie Haydée Lima Ferreira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Research in Microbiology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Pharmacy, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

\*Corresponding author: Humberto Medeiros Barreto. Laboratory of Research in Microbiology, Department of Parasitology and Microbiology, Center of Health Sciences, Federal University of Piauí – UFPI, Teresina, PI, Brazil. *Campus* Petronio Portella, SG-16, Ininga, Zip Code: 64049-550. Phone: +55 (86) 3215-5865. Email: hmbarreto@ufpi.edu.br

**Abstract**

*Acinetobacter baumannii* is an important opportunistic pathogen that causes severe health care-related infections (IRAS), especially in intensive care units (ICUs). The present work aimed to investigate the antimicrobial activity of Riparina B (Rip-B) alone and in association with Norfloxacin against multiresistant strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical material obtained in a Brazilian public hospital. For this, the minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by the microdilution method. For the evaluation of resistance modulating activity, MIC values for antibiotics were determined in the presence or absence of sub-inhibitory concentrations of Rip-B or Chlorpromazine (CPZ), a known inhibitor of bacterial efflux pumps. Results showed that Rip-B presented a weak intrinsic activity against strains tested. On the other hand, when it was associated with Norfloxacin at subinhibitory concentrations, Rip-B reduced MIC values of these antibiotics against *A. baumannii* strains expressing resistance mediated by efflux pump phenotype. This modulating effect was not

verified when Rip-B was associated with the same antibiotics against multidrug-resistant *A. baumannii* strains that did not expressed resistance mediated by efflux pump phenotype. These results show that Rip-B is promising for use in combination with Norfloxacin in the treatment of infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* expressing efflux pump phenotype.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*; Riparin B; resistance to antibiotics; efflux pumps; efflux pump inhibitors.

## 1. Introduction

Infections caused by multidrug-resistant microorganisms are a current problem of public health all over the world and they have increased the morbidity and mortality rates in the population [1, 2]. Previous data from National Network for Monitoring Microbial Resistance in Health Services showed that *Acinetobacter* spp. is the most critical of all the types including multidrug-resistant bacteria which are particularly dangerous in hospital areas, retirement houses and among patients whose care demand the use of ventilators and intravenous catheter [3].

The *A. baumannii* is an aerobic, unfermented, Gram-negative, coccobacillus labeled as an opportunistic pathogen widely associated with infection outbreaks related to health assistance (IRAS), verified in ICU environments [4]. The types of infections caused by that pathogen are closely linked to pneumonia, septicemia, meningitis, urinary tract infections, surgical wounds, previous antibiotic therapy, burns, and immunosuppression diagnosis [5]

*A. baumannii* shows unconventional resistance to multiple drugs, and it may also bear countless protection mechanisms against most regular antibiotic substances used in its treatment [6]. This resistance might come from uncounted mechanisms, intrinsic or acquired, as a result of an overproduction of efflux-pumps, permeability reduction of the outer membrane, amendment of the target site, and production of beta-lactamases [7].

The search for alternative therapies to resistant micro-organisms inspires researches on the microbicidal potential of some plants and its metabolite [8,9] such as the substance alcamida, separated from the unripe fruit of *Aniba Riparia*(Nees) Mez belonging to Lauraceae family. In addition to the natural occurrence of molecules originated in *A. Riparia*, and using Schotten-Bauman reaction[10], the results showed the synthetic similar substances named Riparinas A, B, C, D, E e F. The Riparinas I, II e III are substances that occur naturally isolated from *A. Riparia*. These chemical compounds derived from riparinas showed diverse biological activities.

Previous research carried out by our group pointed out that Riparina B was able to enhance the action of the antibiotics Norfloxacin e Ciprofloxacin by the inhibition of efflux pump Nor A of *Staphylococcus aureus* [11]. Thus, the result motivated us to investigate if Riparina B could modulate the resistance of isolated clinics from *A. baumannii* bearing resistance phenotype mediated by efflux pump. The goals of this research are assessing the intrinsic antibacterial activities of Riparina B against isolated clinics of *A. baumannii*, as well as investigate the resistance modular activity of traditionally used antibiotics against isolated clinics from *A. baumannii* bearing a resistance phenotype of efflux pumps.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Strains and chemicals*

Evaluation of the Rip-B antimicrobial activity was performed against multidrug-resistant *A. baumannii* strains isolated from patients attended in a urgency hospital from Teresina, Piauí, Brazil. Assays for evaluation of the modulating effect of Rip-B on the antibiotic resistance were performed with multidrug resistant *A. baumannii* previously screened to resistance mediated by efflux pump phenotype with Carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP). For a comparison, also were conducted assays with strains

expressing resistance not mediated by efflux pumps. Bacterial strains were maintained on Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Himedia, India) slants at 4 °C, and prior to assay the cells were grown overnight at 37 °C in Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, India). Norfloxacin (Nor), Ethidium Bromide (EtBr) and Chlorpromazine (CPZ) were obtained from Sigma Chemical Corp., St. Louis. Nor was dissolved in a mixture of 1 M NaOH and sterile distilled water (1:9 proportion). EtBr and CPZ were dissolved in sterile water. *N*-[2-(3,4-dimethoxy-phenyl)ethyl]-benzamide (Riparin-B) was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO – Merck) and then diluted with sterile water.

## *2.2. Determination of the occurrence of resistance mediated by efflux pump phenotype*

To verify the occurrence of efflux pump-mediated resistance, MIC values of Amikacin, Ceftazidime or Norfloxacin were determined in the presence or absence of a Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) solution at sub-inhibitory concentration. CCCP is a decoupler from oxidative phosphorylation that interrupts the proton gradient of membranes. Microtitulation plates were incubated at 37 °C for 24 hours and following this time 20 µl of a 0.01% (w/v) aqueous Resazurin sodium solution was added to each well. This plates were incubated for 1 hour at room temperature where following this period a reading was performed taking into account that a change in coloration from blue to pink indicated the occurrence of bacterial growth due to resazurin reduction [12,13]. As a criterion for classifying occurrence of resistance mediated by eflux pump phenotype, a minimum of a 2-fold antibiotic MIC reduction in the presence of CCCP was necessary [14].

## *2.3. Assays for evaluation of the intrinsic antimicrobial activity*

Stock solutions of Rip-B or CPZ were prepared in DMSO followed by dilution in sterile distilled water to a final concentration of 1024 µg mL<sup>-1</sup>. Minimal inhibitory concentrations

(MICs) were determined by microdilution assay in BHI broth with bacterial suspensions of approximately  $10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> and concentrations of Rip-B (or CPZ) solution ranging from 8 to 512  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Microtiter plates were incubated at 37 °C for 24 h, then 20  $\mu$ L of resazurin (0.01% w/v in sterile distilled water) was added to each well to detect bacterial growth by visual color change from blue to pink as described above.

#### *2.4. Assays for evaluation of the drug-resistance modulation*

To evaluate if Rip-B was able to modulate antibiotic resistance in *A. baumannii* strains expressing or not resistance mediated by efflux pump phenotype, MIC value for Norfloxacin was determined in the presence or absence of Rip-B solution at sub-inhibitory concentration (MIC 1/8). Antibiotic concentrations ranged from 0.125 to 128  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Microtiter plates were incubated at 37 °C for 24 h and readings were performed with resazurin as described above. To verify if the drug-resistance modulation occurred due to efflux pump inhibition, modulation assays were performed replacing antibiotics by EtBr, which is a known substrate of efflux pumps [15]. Control assays were also performed replacing Rip-B by CPZ which is a known efflux pump inhibitor [16]. Microtiter plates were incubated at 37 °C for 24 h, then 20  $\mu$ L of resazurin (0.01% w/v in sterile distilled water) was added to each well to detect bacterial growth by visual color change from blue to pink as described above.

#### *Statistical analysis*

Experiments were performed in triplicate and results were normalized by calculation of geometric mean values. Error deviation and standard deviation of the geometric mean were revealed. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism, version 5.02. Differences between treatment with antibiotics (or EtBr) alone or associated with Rip-B or CPZ were

examined using one-way analysis of variance (ANOVA). The differences mentioned above were analyzed by Bonferroni posttest and  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. Results and Discussion

Due to the high prevalence of infections caused by multidrug resistant *A. baumannii*, mainly in hospital environments, researches of new antimicrobial agents effective against this pathogen have been considered as a priority. In the present study, the derivative synthetic Rip-B was investigated for its potential antimicrobial against different *A. baumannii* strains isolated from an urgency hospital of Teresina, Piauí, Brazil.

A previous study showed that natural riparins I, III and XII isolated from *A. riparia* had antibacterial activity against multidrug-resistant *S. aureus* and *E. coli* strains [17]. On the other hand while the synthetic analog Rip-E showed a good antibacterial activity against *S. aureus* strains, the synthetic derivative Rip-B was inactive against *S. aureus* [11]. Results found in the present study were similar to that verified for *S. aureus* once Rip-B was inactive or weakly active against the majority of the *A. baumannii* strains tested (Table 1). These results show that Rip-B it is not recommended for use as an antimicrobial agent.

The natural Rip-III isolated from *A. riparia* was able to induces plasmid elimination in *S. aureus* strains changing the Penicillin resistance phenotype to sensitive [18]. In the present study, Rip-B was tested for its ability to potentiate the activity of the Norfloxacin against *A. baumannii* strains expressing or not resistance mediated by efflux pump phenotype, with the goal of suggest a possible use of Rip-B as an adjuvant of these antibiotics in the treatment of *A. baumannii* infections.

In the tests where Rip-B was added at subinhibitory concentration there was a significant reduction in the MIC values for Norfloxacin only in the strains expressing resistance mediated by efflux pump phenotype (Figures 2 and 3). These results indicate that Rip-B is a modulating

agent of the drug resistance in *A. baumannii* strains, acting probably as an inhibitor of *A. baumannii* efflux pumps. This hypothesis was corroborated by results obtained for the known NorA inhibitor CPZ [16] that also modulated the antibiotic resistance only in the strains expressing resistance mediated by efflux pump phenotype.

Ethidium Bromide (EtBr) is a genotoxic dye that intercalate into DNA double-helix leading to DNA damage and cell death and the only one mechanism of resistance known to EtBr in bacteria is mediated by efflux pump [15]. Thus, this intercalating agent has been used as an indicator of the resistance mediated by efflux pumps [19]. In the present study, modulating effect of Rip-B on the resistance to EtBr was verified only in the strains expressing resistance mediated by efflux pump phenotype (Figure 4). These results are a strong evidence that modulating of the antibiotic resistance by Rip-B could be due to efflux pump inhibition.

In fact, a previous study reported that Rip-B is an inhibitor of NorA, a proton-motive force dependent efflux pump of *S. aureus* belongs to the Major Facilitator Superfamily (MFS), able to compete with antibiotic by the same binding pocket formed by ILE19, ILE23, PHE26, PHE47, ALA48, GLN51, MET109, THR113, SER133, ILE136, THR211, ARG310, ILE313, THR314, ASN332, SER333, THR336, SER337, ASN340 and PHE341 [11]. NorA is able to extrude hydrophilic fluoroquinolones, as Norfloxacin and Ciprofloxacin, and other biocides as quaternary ammonium compounds and EtBr [20].

In *A. baumannii*, resistance to Norfloxacin can be mediated by the multidrug efflux pump AdeABC, a proton-motive force dependent efflux pump belongs to the Resistance and Nodulation Cell Division (RND) [14, 21-24]. High frequencies of overexpression of *adeABC* gene was reported for clinical isolates of *A. baumannii* from Brazil [24] and France [25].

Multidrug-resistant strains overexpressing efflux pumps are able to extrude this antibiotic reducing its intracellular concentrations. Thus, it is possible that the strains tested in the present study could overexpress AdeABC or other efflux pumps that were inhibited by Rip-

B. In its turn, inhibition of efflux pumps by Rip-B could lead to a higher antibiotic accumulation in periplasm or cytoplasm where antibiotic targets are located enhancing their activity.

#### **4. Conclusion**

Combination of antibiotics with efflux pumps inhibitors could be a promising strategy for treatment of infections caused by multidrug resistant *A. baumannii*. Results found in the present study showed that Rip-B was inactive against *A. baumannii* strains. However, Rip-B was able to enhance the activity of Norfloxacin against *A. baumannii* strains overexpressing resistance mediated by efflux pump phenotype. Results obtained through Rip-B/EtBr association assays suggested that enhancement of the antibiotic activity probably involves the inhibition of efflux pumps overexpressed in the strains tested. Thus, Rip-B could be applied as an adjuvant of the Norfloxacin in the treatment of infections caused by multidrug-resistant *A. baumannii* strains overexpressing efflux pumps.

#### **Conflict of interest**

The authors declare no competing financial interest.

#### **Acknowledgment**

The authors are grateful to the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant: 050/2019) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (grant: 050/2019) for the financial support.

## References

- [1] B. Strommenger, M. D. Barterl, K. Kurt, F. Layer, S.M. Rohde, K. Boye, H. Westh, W. Witte, H. de Lencastre, U. Nubel, 2014. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* towards increasing resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 3, p. 616-622, <https://doi.org/10.1093/jac/dkt413>.
- [2] E. L. Camacho, R.G. Gil, R. Tobes, M. Manrique, M. Lorenzo, B. Galvan, E. Salvarelli, Y. Moatassim, I. J. Salanueva, E. Pareja, F. M. Codoner, M. A. Tejado, M.P.G. Barcia. F. de la Cruz, J. Mingorance, 2014. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumonia* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 3, p. 632-636, <https://doi.1093/jac/dkt419>.
- [3] ANVISA (National Health Surveillance Agency). Patient Safety and Quality in Health Services Bulletin 16: Evaluation of national indicators of Health Care-Related Infections (IRAS) and microbial resistance in 2016. <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-n-16-avaliacao-dos-national-indicators-of-infections-related-to-health-care-irons-and-microbial-resistance-of-the-year-of-2016>, 2016 (accessed in 05 of September of 2019).
- [4] A.F. Martins, A.L. Barth, 2013. Multidrug-resistant acinetobacter - a public health challenge. *Sci Med*, vol. 23, p. 56-62.

- [5] S. Figueiredo, L. Poirel, A. Papa, V. Koulourida, P. Nordmann, 2009. Overexpression of the naturally occurring blaOXA-51 gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAb9. *Antimicrob Agents Chemother*, v.53, n.9, p.4045-4047, <https://doi:10.1128/AAC.00292-09>.
- [6] A.P. Zavascki, C.G. Carvalhaes, R.C. Picao, A.C. Gales, 2010. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. Jan; v.8, n<sup>o</sup>.1, p.71-93. <https://doi:10.1586/eri.09.108>.
- [7] C.R. Lee, J.H.Lee, M. Park, K.S. Park, II K. Bae, Y. B. Kim, C. J. Cha, B.C. Jeong, S. H. Lee, 2017. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, <https://doi:10.3389/fcimb.2017.00055>.
- [8] L.F. Zafalon, N.A Filho, J.V. Oliveira, F.D.Rezende, 2007. Subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*: cost-benefit of antibiotic therapy in lactating cows. *Brazilians Archives of Veterinary Medicine and Animal Science*, v.59, p.577-585. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000300005>
- [9] C. Werkman, D.C.Granato, W.D. Kerbaui, F.S. Sampaio, A.A.H. Brandão, S.M. Rode,2008. Therapeutic applications of *Punica granatum* L. (pomegranate). *Brazilian Journal of Medicine*, v. 10, p.104-111.

- [10] S.J.C.Gutierrez, 2007. Synthesis of Bowdenol, a Dihydrobenzofuranoid Isolated from *Bowdichia Virgilioides* and Preparation of Riparina Derivatives Isolated from *Aniba Riparia* with Potential Biological Activity. Ph.D. Thesis, UFPB / CCS: João Pessoa, Brazil.
- [11] L.M. Costa, E.V. de Macedo, F.A.A. Oliveira, J.H.L. Ferreira, S.J.C. Gutierrez, W.J.Pelaez, F.C.A.Lima, J.P. de Siqueira Júnior, H.D.M.Coutinho, G.W. Kaatz, R.M. de Freitas, H.M.Barreto, 2016. Inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by synthetic riparins. *Journal of Applied Microbiology*, v. 121, p. 1312-1322. <https://doi:10.1111/jam.13258>.
- [12] J.C. Palomino, M. Camacho, F. Portaels, J.C.Palomino, 2003. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3616-19, doi: 10.1128/AAC.47.11.3616-3619.2003.
- [13] C.M. Mann, J.L.Markham, 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Applied Microbiol*, 84:538-44, doi:10.1046/j.1365-2672.1998.00379.
- [14] A. Ardebili, M. Talebi, L. Azimi, A.L. Rastegar, 2014. Effect of Efflux Pump Inhibitor Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone on the Minimum Inhibitory Concentration of Ciprofloxacin in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Jundishapur J Microbiol* 2014;7: 1-5, <https://doi:10.5812/jjm.8691>.
- [15] P.N. Markham, E. Westhaus, K. Klyachko, M.E. Johnson, A.A. Neyfakh,1999. Multiple Novel Inhibitors of the NorA Multidrug Transporter of *Staphylococcus aureus* Multiple Novel

Inhibitors of the NorA Multidrug Transporter of *Staphylococcus aureus*, 43 (1999) 2404–2408.

[16] A.A. Neyfakh, C.M. Borsch, G.W. Kaatz, 1993. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter, *Antimicrob. Agents Chemother.* 37 (1993) 128–129. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.1.128>

[17] R. M. R. Catão, J.M. B. Filho, S.J.C. Gutierrez, E.O. Lima, M.S.V. Pereira, T.A. Arruda, R.M.P. Antunes, 2005. Evaluation of the antimicrobial activity of Riparinas on multi-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains. *Rev Bras Anal Clin*, v. 37, p. 247–249.

[18] R. M. R. Catão, J.M. B. Filho, E.O. Lima, M.S.V. Pereira, T.A. Arruda, R.P.A. Miranda, 2010. Evaluation of antimicrobial activity and biological effects of riparins on elimination of drug resistance in samples of *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Anal Clin*, v. 42, p. 9–14.

[19] A.M.B. Ribeiro, J.N. Sousa, L.M. Costa, F.A.A. Oliveira, R.C. Santos, A.S. Nunes, W.O. Silva, P.J.M. Cordeiro, J.S. Lima Neto, J. P. Siqueira Junior, G.W. Kaatz, H. M. Barreto, A.P. Oliveira, 2019. Antimicrobial activity of *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by Phyllanthin. *Microbial Pathogenesis*, p. 242-246. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.012>.

[20] B.D. Schindler, G.W. Kaatz, 2016. Multidrug efflux pumps of Gram- positive bacteria. *Drug Resist. Updat.* 27, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.003>

- [21] C.F. Xu, S.R. Bilya, W. Xu, 2019. AdeABC efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbes and New Infections*, vol. 30, n. C. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100549>.
- [22] A.R. Lari, A. Ardebili, A. Hashemi, 2018. AdeR-AdeS mutations & overexpression of the AdeABC efflux system in ciprofloxacin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Indian J Med Res* 2018; 4:413-21, [https://doi: 10.4103/ijmr.IJMR\\_644\\_16](https://doi: 10.4103/ijmr.IJMR_644_16).
- [23] W. Zhu, H. Wang, J.P. Zhang, 2017. A comparison of adeB gene expression levels under conditions of induced resistance by different drugs in vitro in *Acinetobacter baumannii*. *Exp Ther Med*, vol. 13, p. 2177-2182. <https://doi: 10.3892/etm.2017.4242>.
- [24] J.P. Cardoso, R. Cayo, R. Girardello, A.C. Gales, 2016. Diversity of mechanisms conferring resistance to  $\beta$ -lactams among OXA-23–producing *Acinetobacter baumannii* clones. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 85, p. 90–97. <https://doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.018>
- [25] E. J. Yoon, Y. N. Chabane, S. Goussard, E. Snesrud, P. Courvalin, E. Dé, C. Grillot-Courvalina, 2015. Contribution of Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Systems to Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*. *mBio*, vol. 6, n. 2. <https://doi: 10.1128/mBio.00309-15>.

## Figure Captions

Figure 1. Chemical structure of the Riparin B.

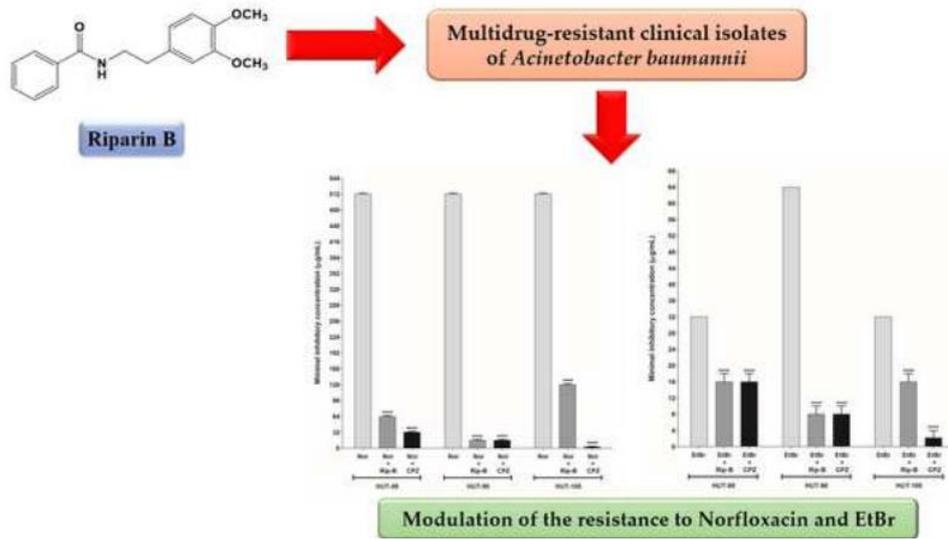
Figure 2. MIC values for Norfloxacin (Nor) found in the absence or presence of the Rip B and Chlorpromazine (CPZ) against clinical isolates of *A. baumannii* that not express resistance mediated by efflux pump phenotype. Each result is the geometric mean of three simultaneous experiments. (\*\*\*) Statistically significant values ( $p < 0.0001$ ).

Figure 3. MIC values for Norfloxacin (Nor) found in the absence or presence of the Rip B and Chlorpromazine (CPZ) against clinical isolates of *A. baumannii* expressing resistance mediated by efflux pump phenotype. Each result is the geometric mean of three simultaneous experiments. (\*\*\*) Statistically significant values ( $p < 0.0001$ ).

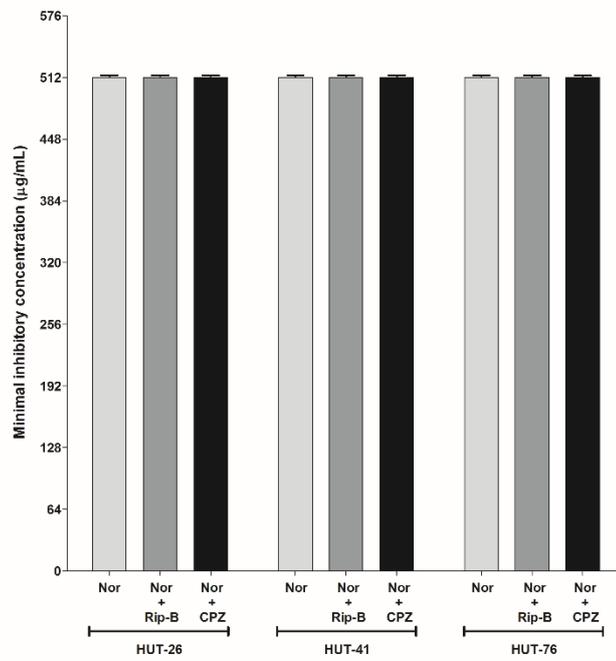
Figure 4. MIC values for Ethidium bromide (EtBr) found in the absence or presence of the Rip B and Chlorpromazine (CPZ) against clinical isolates of *A. baumannii* expressing resistance mediated by efflux pump phenotype. Each result is the geometric mean of three simultaneous experiments. (\*\*\*) Statistically significant values ( $p < 0.0001$ ).

FIGURAS

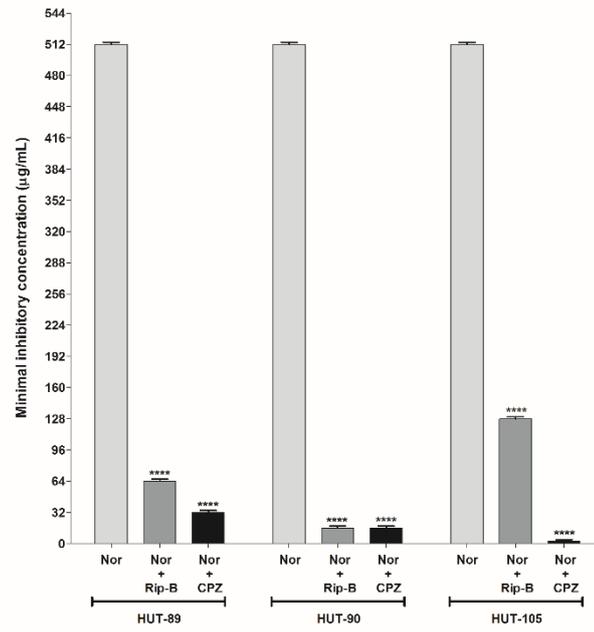
1



2



3



4

