



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

JORGE BELÉM OLIVEIRA JÚNIOR

**Riparina III associada a antimicrobianos: citotoxicidade, atividade
antibacteriana, inibição e erradicação de biofilme**

RECIFE
2023

JORGE BELÉM OLIVEIRA JÚNIOR

Riparina III associada a antimicrobianos: citotoxicidade, atividade antibacteriana, inibição e erradicação de biofilme

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Fábio André Brayner
dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Alves.

Recife
2023

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

O48r

Oliveira Júnior, Jorge Belém

Riparina III associada a antimicrobianos: citotoxicidade, atividade antibacteriana, inibição e erradicação de biofilme / Jorge Belém Oliveira Júnior . – 2023.

211 p. ; il.

Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.

Coorientador: Luiz Carlos Alves.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2023.

Inclui referências e apêndices.

1. Aniba riparia. 2. Staphylococcus aureus. 3. Acinetobacter baumannii. 4. Biofilmes. 5. Microscopia eletrônica. I. Santos, Fábio André Brayner dos (orientador). II. Alves, Luiz Carlos (coorientador). III. Título.

616.9 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2023 - 146)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

JORGE BELÉM OLIVEIRA JÚNIOR

Riparina III associada a antimicrobianos: citotoxicidade, atividade antibacteriana, inibição e erradicação de biofilme

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Aprovado em: 03/04/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Examinador Interno)
Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz/PE)

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof.^a Dr.^a Gláucia Manoella de Souza Lima (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof.^a Dr.^a Ana Beatriz Sotero Siqueira (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof.^a Dr.^a Danielle Patrícia Cerqueira Macedo (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedico,

*Meus sinceros e mais extensos
agradecimentos ao meu pai-avô José Júlio
Brechtó, in memoriam, que sempre me
apoio, principalmente em relação aos meus
estudos e minha vida.*

*À minha mama, maravilhosa... o amor da
minha vida, minha mãe, por todo apoio
incondicional dedicado a mim, estando
presente, mesmo longe, nas minhas lutas
diárias, me impulsionando.*

AGRADECIMENTOS

DEUS e mim

Primeiramente, agradeço a DEUS por ser o meu suporte espiritual e, principalmente, por ser o meu Porto Seguro nos momentos de tormentos, tribulações e decepções, além de me proporcionar realizações profissionais e pessoais... e nunca me abandonou. Desde minha vinda ao Recife/PE no ano de 2016 para iniciar o mestrado... tudo – absolutamente tudo – ocorreu apenas pela vontade de DEUS. Abdiqueei de bastantes momentos e vivências com meus familiares e amigos(as); no entanto, tudo valeu a pena.

Segundamente, agradeço a mim por toda luta diária - somente eu sei o que passei, o que vi e o que ouvi durante este período - e pela busca pelo meu melhor como profissional; tudo isso me tornou um ótimo profissional.

Familiares

Aos meus amores, minhas irmãs Thati e Nathy, por terem me dado apoio psicológico e amoroso, se mostrado generosas, sempre me ouvindo quando necessitei, sem me deixar entristecer pelas dificuldades da vida. Ao meu cunhado Claudio, vulgo Craudio ou Kiko, por me auxiliar e socorrer sempre que houve necessidade. E aos meus sobrinhos lindos e maravilhosos, Valentina e Cristoph, por me fortalecerem através de seus abraços, beijos e sorrisos sempre que os visitava. Amo muito vocês!!!

À minha tia Prof^a. Dr^a. Jonorete de Carvalho, por estar presente em todos os momentos nesta minha jornada de doutoramento, me indicando o melhor caminho acadêmico a seguir e por ser um espelho de dedicação e responsabilidade. E por todas as vezes me ajudar, sem pensar...

À minha avó Angelita, minha linda dona Gel, pelos questionamentos, pelas “saudades” e pelas longas conversas. Te amo para sempre!!!

À Ancelmo, por estar ao meu lado d-i-a-r-i-a-m-e-n-t-e, me apoiando em todas as minhas decisões, principalmente, por todos os incentivos, calmarias e cuidados em saber me ouvir, me entender... e por todo amor. #AmoTuAmor

Aos demais familiares, que direta ou diretamente, contribuíram para a construção e desenvolvimento desse projeto: minha estrela linda, tia Rita (*in memoriam*), tia Zeza e Neide; aos meus tios Jorge, Zé e Ito; e aos meus primos Lucas, Vinícius e João.

Saúde mental

À Silvana, minha terapeuta, pelo acompanhamento e ajuda para melhoria da minha saúde mental. Desde o advento da pandemia, ansiedade e síndrome de pânico me “assolaram”, tirando-me o meu eixo. No entanto, tudo foi resolvido com o auxílio de minha terapeuta. Não tenho como te agradecer!!

Amigos antigos

Aos meus amigos: Fábio Bilú, Lili, Nana, Luiz, Sidy e Anna, pelo incentivo durante todo o processo do doutoramento e por me ajudarem nas minhas expectativas e frustrações. Pelas saudades, pelas conversas, pelos encontros e risadas!!!

Sem esquecer de Felipe, meu irmão/amigo. Saudades!!!

Ao meu irmão/amigo Ricardo Amorim (Riquinho), *in memoriam*, por sempre torcer por mim e para que eu obtivesse o melhor todos os dias. Saudades eternas!!!

À família Menezes (D. Maria, Kaquinha e Aninha) por não me deixar desistir dos meus sonhos, me mantendo no foco e me incentivando a lutar por meus ideais acadêmicos. Pelos abraços, conselhos, presentes e lanchinhos. #Amo

À equipe do Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), por me incentivarem e colaborarem com a melhoria profissional e

parceria, em especial, Prof^a. Dr^a. Fernanda Maranhão, por me ouvir, incentivar e me apoiar na minha jornada, e além de tudo, confirmar no meu potencial.

Ao grupo “a-m-i-g-o-s”: Neto, Iury, Rosane, Carlos, Barna e Jacque por todo apoio e pelas risadas.

Amigos novos

Ao meu grande amigo Everton, que mesmo distante - ele é “inglesado”, do exterior - me ajudou em cada etapa do doutoramento com seu incentivo para que eu me tornasse um ótimo profissional, além dos enormes auxílios nos artigos, submissões e traduções.

À minha amiga, Dr^a. Fernanda (Nanda ou Really!!) por ter me acolhido no #teambacteria e me ajudado sempre que necessitei, estando comigo nos momentos bons e ruins. Ajudou-me a elaborar e desenvolver este projeto. Um obrigado eterno a ti, miga. E no pós-LBCM, esteve comigo em todos os momentos bons e ruins.

Às minhas amigas Dr^a. Karla Ribeiro e Dr^a. Taci Higino por todo ensinamento laboratorial e de vida, além de todo incentivo profissional e pessoal. E por me incentivarem bastante na reta final do doutoramento.

Um agradecimento especial à minha primeira IC, Daivyane (Daiv Maria), sendo que grande parte desse projeto é por sua dedicação em me ajudar. Nunca me abandonou e sempre esteve lá para compartilhar/apoiar as minhas loucuras. #AmoTuNega

Às amigas e parceiras de projetos futuros que contribuirão demais para o desenvolvimento desse trabalho: Dr^a. Elza Firmo e Dr^a. Cynthia Soares.

Ao meu amigo/irmão e parceiro de projetos, Antônio Carlos, vulgo Tonho, que pode me mostrar outros caminhos da Microbiologia, como a Microbiologia de

Alimentos. Ajudou-me bastante quando necessitei de um auxílio e ideias. Um homem que tenho bastante orgulho de ser amigo.

Outros(as) amigos(a) importantes: Vivi, Rita, Rebeca, Rosilma.

Laboratório

Aos meus orientadores Dr. Fábio Brayner e Dr. Luiz Carlos Alves pelas oportunidades e ensinamentos que promoveram o meu crescimento profissional.

Aos companheiros (e ex-companheiros) do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM) - Departamento de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz/PE), que contribuíram demais com o desenvolvimento desse projeto: Lucas, Dr^a. Amanda (lindinha), Dr. Nairomberg (Bergsom), Victor (Todo boy), Dr. Alberon e Dr. Rubens. E aos demais colegas do laboratório.

Equipe de Pesquisa

Ao Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí e Dr. José Maria Barbosa Filho do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, por confiarem em nosso projeto e ceder, gentilmente, os compostos utilizados neste projeto.

Universidade Federal de Pernambuco

Ao Sr. Walter, Neemias e à equipe administrativa da Pós-graduação em Medicina Tropical, pelas dicas e por me dá um suporte acadêmico.

À turma de Pós-graduação em Medicina Tropical (2018.1) por todos os momentos durante as aulas, com muitas risadas e poucas lágrimas, em especial: Luan, Lucas, Marcela, Leyla e Kamila.

Às minhas amigas de desabafos (criamos um grupo chamado “SOCORRO!!!”) por todo apoio em que pudemos nos abraçar e nos ajudar nessa nossa jornada: Dr^a. Gleici e Dr^a. Kaliene.

Aos professores/membros do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, em especial, Dr. Bruno Severo, Dr. Reginaldo Gonçalves, Dr^a. Virginia de Lorena e Dr^a. Líbia Moura por toda confiança durante a pós-graduação e pelas inúmeras discussões e incentivos em sala de aula.

À professora Dr^a. Sylvia Hinrichsen por ter acreditado no meu potencial para auxiliar no desenvolvimento da disciplina “Biossegurança e Controle de Infecções Risco Sanitário Hospitalar” desde o ano de 2016 até 2021.

À técnica do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPE) do setor de Microbiologia, Graça, por partilhar todo seu conhecimento sobre Microbiologia e os inúmeros testes bioquímicos de identificação.

À equipe do Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto Keizo Asami (LIKA/UFPE).

Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz/PE)

À equipe do Setor de Esterilização do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, Edson, Rita e Nelson, por ter ajudado, direta ou indiretamente no desenvolvimento desse projeto.

Aos demais funcionários do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

Tese

Aos membros da banca de qualificação, pelas contribuições para o desenvolvimento dessa pesquisa. E aos membros da banca de defesa: Prof^a. Dr^a. Gláucia Manoella de Souza, Prof^a. Dr^a. Ana Beatriz Sotero, Prof. Dr. Reginaldo

Gonçalves e Prof^a. Dr^a. Danielle Patrícia Macedo pelos questionamentos e esclarecimentos para a melhoria e aprimoramento desse estudo. Um destaque para Prof^a. Dr^a. Gláucia e Prof^a. Dr^a. Ana Beatriz, que estão comigo desde a qualificação do projeto de mestrado e durante o meu doutoramento, que me apoiam e acreditaram em mim através convites para desenvolver projetos, participação em bancas de defesas e conselhos acadêmicos. Muito obrigado por tudo!!!

Outros agradecimentos não menos importantes

Ao grupo “Bolsistas CAPES” do Facebook, pelos esclarecimentos e incentivos em cada etapa da pós-graduação.

À ferramenta *on line* Sci-hub, pelos artigos científicos disponibilizados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste projeto.

“... né tu nada, estrelo.”

(BRECHÓ, 1995, p. 1)

RESUMO

O aumento da pressão seletiva bacteriana, bem como o uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos proporcionam a identificação recorrente de isolados clínicos multidroga-resistente (MDR) envolvidos em Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e redução das opções terapêuticas. Habitualmente, ademais dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos convencionais, diversas espécies bacterianas são descritas como formadoras de biofilme, como *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii*, sendo este um dos principais fatores de virulência. Como a terapia combinada entre antimicrobianos pode resultar em um efeito antagônico ou indiferente, além do fator de toxicidade elevado, por isso a investigação da combinação entre composto natural de origem vegetal e antimicrobiano vem sendo amplamente discutida, devido às diversas atividades biológicas, fácil acesso e baixo custo. Logo, o objetivo deste estudo foi investigar a citotoxicidade da riparina III associada a antimicrobianos e avaliar sua atividade antibacteriana, inibitória e erradicatória do biofilme e as possíveis alterações ultraestruturais em isolados clínicos multidroga-resistentes (MDR) de *A. baumannii* e *S. aureus*. A concentração inibitória mínima (CIM) da riparina III e de cada antimicrobiano (ciprofloxacina, oxacilina, meropenem e colistina) foi determinada por microdiluição em caldo em isolados clínicos MDR. Pelo método do *Checkerboard* foi definido o tipo de interação das combinações e a análise da CIM reversa das combinações sinérgicas. O tempo de morte dos isolados clínicos MDR foi avaliado baseado apenas nas combinações sinérgicas nas respectivas espécies bacterianas. A combinação sinérgica foi investigada quanto sua ação hemolítica *in vitro* e os isolados clínicos MDR foram observados quanto às alterações ultraestruturais nas concentrações subinibitórias através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Transmissão (MET), além de submetidos à formação de biofilme, bem como a inibição e a erradicação do biofilme na presença da combinação sinérgica. Para os isolados 54 e 808 (*A. baumannii*), o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) exibiu o efeito sinérgico na combinação riparina III/colistina, sendo observadas diversas alterações ultraestruturais nas células bacterianas. A ação hemolítica da combinação entre riparina III e colistina exibiu um baixo percentual hemolítico e os isolados clínicos avaliados foram classificados como forte formadores de biofilme e a combinação sinérgica inibiu e erradicou os biofilmes produzidos ambos os isolados de *A.*

baumannii. A identificação de espécies bacterianas MDR envolvidas em IRAS tem limitado as opções terapêuticas; por isso, o uso da terapia combinada entre composto natural e antimicrobianos convencionais pode alterar a dose ideal com eficácia terapêutica, bem como diminuir o efeito tóxico dos antimicrobianos. Logo, a combinação entre a riparina III e colistina apresentou uma interação sinérgica contra isolados clínicos de *A. baumannii* MDR, com diminuição significativa da concentração ideal da colistina, além de exibir baixo percentual hemolítico, inúmeras alterações ultraestruturais, sendo capaz de inibir e erradicar o biofilme de *A. baumannii*. Assim, estas informações demonstraram que a combinação entre riparina III e colistina pode ser uma opção promissora, visto o potencial antimicrobiano constatado pelas espécies bacterianas, a tornando bastante eficaz contra *A. baumannii* MDR.

Palavras-chave: Aniba riparia; *Staphylococcus aureus*; *Acinetobacter baumannii*; biofilme; microscopia eletrônica.

ABSTRACT

The increase in bacterial selective pressure, as well as the indiscriminate and inappropriate use of antimicrobials, has promoted the recurrent identification of multidrug-resistant (MDR) clinical isolates involved in healthcare-associated infections (HAIs) and reduction of therapeutic options. Usually, in addition to traditional antimicrobial resistance controls, several bacterial species are described as biofilm formers, such as *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*, which are one of the main virulence factors. The combined therapy between antimicrobials can result in an antagonistic or indifferent effect, in addition to the high toxicity factor, therefore the investigation of the combination of natural compounds of plant origin and antimicrobials for therapeutic purposes has been widely accepted, due to the various biological activities, easy access and low cost. The objective of this study was to investigate the cytotoxicity of riparin III associated with antimicrobials and to evaluate its antimicrobial, biofilm inhibitory and eradicating activity, and the possible ultrastructural changes in MDR clinical isolates of *A. baumannii* and *S. aureus*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of riparin III and each antimicrobial (ciprofloxacin, oxacillin, meropenem and colistin) was determined by microdilution in broth against MDR clinical isolates. The type of interaction of the combinations for Checkerboard method was defined and the analysis of the reverse MIC of the synergistic combinations. The time-kill of the MDR clinical isolates was evaluated based only on synergistic combinations in the bacterial species. The synergistic combination was investigated for its *in vitro* hemolytic action and the MDR clinical isolates were observed for ultrastructural changes at sub-synergistic concentrations through Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Microscopy (TEM), in addition to submitted to biofilm formation, as well as the biofilm inhibition and eradication in the presence of the synergistic combination. For *A. baumannii* isolates 54 and 808, the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) showed the synergistic effect in the riparin III/colistin combination and several ultrastructural changes in bacterial cells. The hemolytic action of the combination of riparin III and colistin exhibited a low hemolytic percentage and MDR clinical isolates were classified as strong biofilm formers and the synergistic concentration of riparin III/colistin inhibited and eradicated the biofilms produced for *A. baumannii* (54 and 808). The identification of MDR bacterial species involved in HAIs has limited therapeutic options; therefore,

the use of combined therapy between a natural compound and conventional antimicrobials can change the ideal dose with therapeutic efficacy, as well as reduce the toxic effect of antimicrobials. Therefore, the combination of riparin III and colistin presented a synergistic interaction against clinical isolates of *A. baumannii* MDR, with a significant decrease in the ideal concentration of colistin, in addition to exhibiting a low hemolytic percentage, numerous ultrastructural changes, being able to inhibit and eradicate the *A. baumannii* biofilm. Thus, this information demonstrated that the combination between riparin III and colistin can be a promising option, given the antimicrobial potential unrecognized by bacterial species, making it quite effective against *A. baumannii* MDR.

Keywords: Aniba riparia; Staphylococcus aureus; Acinetobacter baumannii; biofilm; electron microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Quadro 1 - Espécies vegetais com atividade antimicrobiana frente isolados bacterianos	27
Figura 1 - Localização geográfica de espécimes de <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez. entre os anos de 1843 e 2021	34
Figura 2 - Espécime de <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez. coletada no Brasil	35
Figura 3 - Frutos verdes e folhas da espécie vegetal <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez.	36
Figura 4 - Características químicas, fórmulas estruturais e moleculares da riparina III	38
Figura 5 - Distribuição de percentual do uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos	41
Figura 6 - Colônias de <i>Acinetobacter baumannii</i> cultivadas em ágar MacConkey	44
Figura 7 - Colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivado em ágar manitol salgado..	49
Figura 8 - Ciclo do biofilme demonstrando as principais etapas para sua formação	58
Artigo 1	
Figura 1 - Descrição das características químicas e moleculares da riparina III.....	75
Figura 2 - Curvas do tempo de morte de isolados clínicos de <i>Acinetobacter baumannii</i> (54 e 808) submetidos à concentração subinibitória da combinação da riparina III e colistina	83
Figura 3 - Alterações ultraestruturais induzidas pela ação da riparina III e colistina isoladamente, e a combinação riparina III/colistina em isolados clínicos multidroga-resistentes de <i>Acinetobacter baumannii</i> (54 e 808) por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	84
Figura 4 - Microscopia eletrônica de transmissão de isolados clínicos multidroga-resistentes de <i>Acinetobacter baumannii</i> (54) submetidos à riparina III e colistina isoladamente e combinação de riparina III/colistina.....	86
Figura 5 - Microscopia eletrônica de transmissão de isolados clínicos de <i>Acinetobacter baumannii</i> (808) multidroga-resistentes pela ação de riparina III e colistina isoladamente, e a combinação de riparina III/colistina.....	87

Artigo 2

Figura 1 - Formação, inibição e erradicação do biofilme de <i>Acinetobacter baumannii</i> (isolados 54 e 808) multidroga-resistentes submetidos à combinação de riparina III/colistina	109
Figura 2 - Alterações ultraestruturais pela combinação riparina III/colistina contra biofilme de isolados clínicos multidroga-resistentes de <i>Acinetobacter baumannii</i> (isolado 54).....	112
Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de isolados clínicos multidroga-resistentes de <i>Acinetobacter baumannii</i> (isolado 808) submetidos à combinação riparina III/colistina	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição da classificação sistemática da espécie <i>Aniba riparia</i> (Nees) Mez.	33
Tabela 2 - Caracterização e perfil de resistência aos antimicrobianos de isolados multidroga-resistentes de <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos de hospitais públicos do Recife/PE	62
Artigo 1	
Tabela 1 - Perfil de resistência antimicrobiana de isolados clínicos obtidos em hospitais públicos de Recife/Pernambuco/Brasil	76
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima da riparina III e antimicrobianos de isolados clínicos multidroga-resistentes obtidos em hospitais públicos de Recife/Pernambuco/Brasil.....	80
Tabela 3 - Atividade antimicrobiana da riparina III em combinação aos antimicrobianos contra isolados clínicos multidroga-resistentes de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i>	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CECIH	Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter spp.</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
h	Horas
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
ITU	Infecção do trato urinário
LBCM	Laboratório de Biologia Celular e Molecular
iLIKA	Instituto Keizo Asami
M	Molar
MDR	Multidroga-resistente
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro

MRSA	<i>Methicillin-resistant S. aureus</i>
MTCI	Medicinas Tradicionais, Complementares e Integrativas
NAC/	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAV	Pneumonia associada à ventilação
PDR	Pan droga-resistente
pH	Potencial de Hidrogênio
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
rpm	Rotação por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
XDR	Extensivamente droga-resistente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	PRODUTOS NATURAIS DE ORIGEM VEGETAL	24
2.1.1	Família Lauraceae	28
2.1.1.1	Aniba riparia (Nees) Mez. e riparina III	30
2.2	INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE.....	38
2.2.1	Espécies bacterianas de importância médica	41
2.2.1.1	Acinetobacter baumannii	41
2.2.1.1.1	Resistência antimicrobiana por Acinetobacter baumannii	44
2.2.1.2	Staphylococcus aureus	46
2.2.1.2.1	Resistência antimicrobiana por Staphylococcus aureus.....	49
2.3	PRODUTOS NATURAIS DE ORIGEM VEGETAL ASSOCIADOS AOS ANTIMICROBIANOS	51
2.4	FATORES DE VIRULÊNCIA	54
2.4.1	Biofilme	54
3	OBJETIVOS	60
3.1	OBJETIVO GERAL.....	60
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
4.1	OBTENÇÃO DA RIPARINA III	61
4.2	AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	61
4.3	CEPAS PADRÃO ATCC E ISOLADOS CLÍNICOS	61
4.4	AÇÃO HEMOLÍTICA DA RIPARINA III E ANTIMICROBIANOS.....	62
4.5	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA RIPARINA III E ANTIMICROBIANOS.....	63
4.6	ENSAIO CHECKERBOARD.....	64
4.7	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA REVERSA	64
4.8	TEMPO DE MORTE.....	65
4.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	65
4.10	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	66
4.11	FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	66
4.12	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	67

4.13	ERRADICAÇÃO DO BIOFILME.....	68
4.14	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO BIOFILME.....	68
4.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
4.16	FLUXOGRAMA	70
5	RESULTADOS	71
5.1	ARTIGO 1. ATIVIDADE IN VITRO DA RIPARINA III EM COMBINAÇÃO COM ANTIMICROBIANOS CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS MULTIDROGA- RESISTENTES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS E ACINETOBACTER BAUMANNII	71
5.2	ARTIGO 2. INIBIÇÃO E ERRADICAÇÃO IN VITRO DE BIOFILMES DE ACINETOBACTER BAUMANNII MULTIDROGA-RESISTENTES PELA COMBINAÇÃO DE RIPARINA III E COLISTINA.....	100
6	CONCLUSÃO	123
	REFERÊNCIAS.....	124
	APÊNDICE A - IN VITRO ACTIVITY OF RIPARIN III IN COMBINATION WITH ANTIMICROBIALS AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT CLINICAL ISOLATES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND ACINETOBACTER BAUMANNII	161
	APÊNDICE B - IN VITRO INHIBITION AND ERADICATION OF MULTIDRUG-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII BIOFILMS BY RIPARIN III AND COLISTIN COMBINATION.....	190
	APÊNDICE C - CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS CLÍNICOS MULTIDROGA- RESISTENTES OBTIDOS EM DOIS HOSPITAIS PÚBLICOS DO RECIFE/PE.....	211

1 INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) permanecem como um problema de saúde pública no mundo, no qual cerca de 10 milhões de IRAS têm sido descritas anualmente, em consequência do uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos de amplo espectro, da pouca prevenção da resistência antimicrobiana e da pressão seletiva microbiana, principalmente em países em desenvolvimento e com baixa ou média renda (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; KAYE; GALES; DUBOURG, 2017; CAVALCANTE et al., 2019; WHO, 2021b).

Inúmeras espécies bacterianas estão envolvidas em IRAS em ambientes hospitalares e comunidades em todo o mundo, sendo consideradas persistentes e recorrentes, como *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*, descritas como “superbactérias”, devido seu potencial de virulência (por meio da produção de biofilme) e o alto nível de resistência aos antimicrobianos, promovendo a falha no tratamento de pacientes, devido à diminuição da eficácia e a alta toxicidade dos antimicrobianos disponíveis (CRESS et al., 2014; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; DI DOMENICO et al., 2017; RENNER et al., 2017; WHO, 2017; ASLAM et al., 2018; CHEN et al., 2019; WONGSURAKIAT; CHITWARAKORN, 2019; DABAJA-YOUNIS et al., 2020; de OLIVEIRA et al., 2020; WHO, 2021b).

Os isolados bacterianos multidroga-resistentes (MDR) têm sido uma preocupação cada vez maior nos últimos anos, impulsionando pesquisas na busca e no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Assim, diversos países vêm investindo em pesquisas utilizando espécies vegetais como alternativa para possíveis novos grupos terapêuticos, vislumbrando a produção de fármacos a partir de compostos naturais para o tratamento de pacientes com IRAS (ELLER et al., 2015; ALVES et al., 2016; BESSA et al., 2016; OTHMAN; SLEIMAN; ABDEL-MASSIH, 2019; ANAND et al., 2019).

Sabe-se que as espécies vegetais exibem inúmeras atividades biológicas, incluindo a ação antibacteriana, antifúngica, antibiofilme, entre outras (BEZERRA et al., 2013; MALAFAIA et al., 2018; CORREA et al., 2019; OLIVEIRA JÚNIOR, 2020). Além disso, há relatos que a terapia combinada entre compostos naturais ou sintéticos e antimicrobianos pode elevar a atividade antimicrobiana e inibir a formação de biofilme (BARBIERI et al., 2017; ROSATO et al., 2018; SALEM et al., 2018; ALLAWI,

2019; OLIVEIRA JÚNIOR, 2020). Bush e colaboradores (2014) indicam que é essencial estudar novas alternativas terapêuticas, visando aumentar a ação biológica e minimizar os efeitos tóxicos nos pacientes. Outro aspecto importante é verificar a citotoxicidade através da habilidade de induzir a lise da membrana celular de eritrócitos para determinar o potencial da atividade terapêutica dos compostos naturais (PAILARD et al., 1999; BUNEL et al., 2014).

Neste contexto, a *Aniba riparia* (Ness) Mez., popularmente conhecida como “louro”, “louro-faia” ou “pau-rosa”, é uma espécie vegetal pertencente à família Lauraceae, sendo bastante encontrada em regiões tropicais e subtropicais (BARBOSA-FILHO et al., 1987; BARBOSA et al., 1998; CASTELO-BRANCO et al., 2000; MARQUES, 2001; GARCEZ et al., 2009). A partir do fruto verde ou cálice dessa espécie podem ser obtidos compostos naturais, sendo a riparina III o composto majoritário, representando 34% do extrato natural total (BARBOSA-FILHO et al., 1987; BARBOSA et al., 1998).

Alguns estudos descreveram as atividades biológicas encontradas na riparina III, incluindo a atividade antimicrobiana (BARBOSA-FILHO et al., 1987; BARBOSA, 1988; CATÃO et al., 2005). No ano de 2020, Oliveira Júnior e colaboradores confirmam a atividade antimicrobiana e indicaram, como primeiro relato, a ação inibitória de riparina III na formação do biofilme de isolados MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*, bem como demonstraram sua baixa toxicidade, baixo percentual hemolítico e as possíveis alterações ultraestruturais induzidas nas células bacterianas. Contudo, não há estudos sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* da riparina III associada aos antimicrobianos convencionais utilizados na prática clínica em isolados bacterianos MDR.

A combinação entre compostos ou extratos naturais e antimicrobianos contra isolados bacterianos pode aumentar a atividade antimicrobiana e promover alterações ultraestruturais (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2023). As principais alterações ultraestruturais em *S. aureus* submetidos à artonina E e estreptomicina foram: ruptura parcial e total da parede celular bacteriana (ZAJMI et al., 2015). Ao combinar compostos naturais e antimicrobianos, incluindo oxacilina, pode ser observado um aumento significativo na atividade antimicrobiana contra isolados MDR de *A. baumannii* e *S. aureus* (LAHMAR et al., 2017). Outro estudo determinou a atividade antimicrobiana e inibitória da formação de biofilme de isolados MDR de *A. baumannii*

por melitina associada à colistina ou imipenem, indicando seu potencial no tratamento de pacientes infectados (BARDBARI et al., 2018). Logo, em consequência do aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos disponíveis, novas alternativas terapêuticas para pacientes com IRAS devem ser analisadas, visando contribuir para posteriores estudos sobre alternativas terapêuticas. Para tal, este estudo teve como objetivo investigar a citotoxicidade da riparina III associada a antimicrobianos, a atividade antimicrobiana, além da ação inibitória e erradicatória do biofilme e as possíveis alterações ultraestruturais em *A. baumannii* e *S. aureus*, visando contribuir para posteriores estudos sobre alternativas terapêuticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUTOS NATURAIS DE ORIGEM VEGETAL

O uso de produtos naturais na cura de pacientes com infecções ou doenças é bastante antigo, sendo datado da pré-história, na qual eram usados cataplasmas e infusões diante dos agravos existentes na época, sendo um exemplo a malva-rosa, utilizada para fins terapêuticos por povos que viveram há 60.000 anos. Assim, desde o advento dos antimicrobianos, os produtos naturais são considerados ou uma fonte importante de novas drogas ou propiciam o desenvolvimento de novas drogas sintéticas (WHO, 1998; COWAN, 1999; NEWMAN, 2016; 2017; STAN et al., 2021).

O primeiro registro foi depositado no Museu da Pensilvânia, datado de 2.100 a.C., o qual abrange uma coleção de trinta fórmulas de drogas de origem animal, vegetal e mineral (HELFAND; CRAPO, 1990). Há um manuscrito egípcio *Ebers Papyrus*, de 1.500 a.C., que compreende 811 prescrições e 700 drogas, e, também, o primeiro texto chinês sobre plantas medicinais, datado de 500 a.C., que relata nomes e posologias de plantas para fins terapêuticos (DUARTE, 2004; ARRUDA et al., 2006).

Através da observação coletiva e individual, o povo primitivo experimentou diversas espécies vegetais e determinou suas atividades biologicamente ativas, que o acompanharam desde a pré-história, construindo a medicina do homem primitivo (VON POSER; MENTZ, 2000; COUTINHO et al., 2004). Atualmente é uma tradição, sendo conhecida como “medicina popular”, na qual as informações são transmitidas ao longo de gerações (CATÃO et al., 2006).

Durante anos, os produtos naturais com ação antimicrobiana eram praticamente inexistentes ou restritos, visto a credibilidade da fonte derivada (COWAN, 1999; SUBRAMANI; NARAYANASAMY; FEUSSNER, 2017). Contudo, o crescente surgimento de infecções envolvendo microrganismos resistentes é uma das principais razões para reinvestigar os produtos naturais com atividade antimicrobiana, devido à vida útil relativamente limitada de quaisquer antimicrobianos, reduzindo as opções terapêuticas (COWAN, 1999; CARVALHO et al., 2011; MARMITT et al., 2015a; NEWMAN; CRAGG, 2020; STAN et al., 2021).

Habitualmente, as espécies vegetais sintetizam diversas substâncias que atuam como mecanismo de defesa contra microrganismos, insetos e herbívoros, além de promover algumas características, como: odores, sabor, pigmento, etc.

(SUBRAMANI; NARAYANASAMY; FEUSSNER, 2017). Por isso, diversos países vêm utilizando produtos naturais como alternativa terapêutica (BAKAL et al., 2017; ELISHA et al., 2017; VAN VUUREREN; HOLL, 2017; MARCHESE et al., 2018). O quadro abaixo (QUADRO 1) sintetiza algumas espécies vegetais empregadas como medidas terapêuticas, às quais são bastante utilizadas, especialmente em países em desenvolvimento.

Quadro 1 - Espécies vegetais com atividade antimicrobiana frente isolados bacterianos.

Nome popular	Espécie vegetal	Alvos	Classe
Aloe	<i>Aloe barbadensis</i> <i>Aloe vera</i>	<i>Corynebacterium</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i>	Mistura complexa
Mirtilo	<i>Vaccinium</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>	Monossacarídeo
Manjeriço	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Terpenoides
Pimenta preta	<i>Piper nigrum</i>	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp. <i>E. coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Alcaloide
Caju	<i>Anacardium pulsatilla</i>	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Streptococcus mutans</i>	Polifenóis
Camomila	<i>Matricaria chamomilla</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>S. aureus</i>	Ácido fenólico
Pimenta páprica	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Clostridium sporogenes</i> <i>Clostridium tetani</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	Terpenoides
Alho	<i>Allium sativum</i>	<i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Streptomyces griseus</i> <i>S. aureus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>E. coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Xanthomonas maltophilia</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sulfóxido Terpenoides Sulfatadas Saponinas

Fonte: Martinez et al., 1996; Ofek et al., 1996; Wan et al., 1998; Ghoshal; Krishna Prasad; Lakshmi, 1996; Himejima; Kubo, 1991; Bose, 1958; Hamburger; Hostettmann, 1991; Scheel, 1972; Cichewicz; Thorpe, 1996; Naganawa et al., 1996.

O uso de plantas medicinais como terapia alternativa é incentivado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), à qual descreve que o vegetal, medicinal ou

não, possui “em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas para fins terapêuticos ou prevenção de agravos ou precursores de fármacos semissintéticos” (WHO 1998; BRASIL, 2006b) e seu uso vem crescendo consideravelmente em diversos países (SILVA et al., 2020). Assim, a OMS tem estimulado o uso seguro de plantas medicinais para fins terapêuticos, visto que, aproximadamente, 80% da população mundial utiliza essa opção (BRASIL, 2006a; BOCCOLINI; BOCCOLINI, 2020).

Na década de 1970, o Programa de Medicina Tradicional (*Meeting on the Promotion and Development of Traditional Medicine*), também denominado Medicina Complementar ou Alternativa, criado pela OMS, refere-se a um extenso conjunto de medidas e práticas de atenção à saúde através de teorias e experiências de distintas culturas para propiciar a promoção à saúde, além de prevenção e recuperação. As Medicinas Tradicionais, Complementares e Integrativas (MTCI) são um importante exemplo de cuidado à saúde, sendo, em muitos países em desenvolvimento, a principal oferta de serviços à população; já outros países utilizam a MTCI para complementar o sistema convencional (WHO, 1978).

Inúmeros dados asseguram o importante papel das plantas medicinais no cenário de saúde pública mundial, promovendo o desenvolvimento de estratégias para o combate às infecções causadas por microrganismos MDR (MARMITT et al., 2015b; SUBRAMANI; NARAYANASAMY; FEUSSNER, 2017; MARCHESE et al., 2018; NASUTION et al., 2018; ROCHA et al., 2022; QADRI et al., 2022).

No ano de 2017, Elisha e colaboradores investigaram espécies vegetais com atividade antimicrobiana determinada contra *Escherichia coli*. Neste estudo, foram analisados os extratos de nove espécies vegetais contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*. Os extratos foram ativos contra todos os patógenos, exibindo médias de Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 0.02 e 0.52 mg/mL; porém, as espécies *E. faecalis* e *S. typhimurium*, mostraram-se mais resistentes aos extratos. Dos extratos avaliados alguns apresentaram bom potencial terapêutico contra os patógenos bacterianos.

Sahin e colaboradores (2019) analisaram os compostos bioativos de *Kalanchoe crenata* contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *B. subtilis*. Os autores observaram que na concentração de 10 µg/mL, os compostos não exibiram atividade antimicrobiana contra as cepas bacterianas; contudo, a partir de 50 µg/mL,

foi observada atividade antimicrobiana bastante significativa contra todas as cepas bacterianas analisadas. Posteriormente, Tajudin e Ismail (2022) determinaram as ações de *K. pinnata* na medicina tradicional, identificando a presença de fitoquímicos ou compostos ativos com alto potencial antimicrobiano.

No estudo realizado por Gheda e Ismail (2020), o qual analisou a atividade antimicrobiana de diversas espécies de cianobactérias, foi observado que todos os extratos testados exibiram diferentes graus de atividade antimicrobiana em relação aos patógenos testados (*B. subtilis*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*), indicando que a atividade antimicrobiana dos extratos dependeu, principalmente, da espécie de cianobactéria, do solvente utilizado e do patógeno testado.

Um estudo realizado com plantas medicinais (*Centella asiatica* e *Gigantochloa apus*) utilizadas no tratamento de tuberculose na Indonésia comparou a atividade antimicrobiana entre si contra cinco espécies bacterianas. Ambas as espécies vegetais apresentaram atividade antimicrobiana, com destaque para *C. asiatica*, que foi bastante ativa contra *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella typhi*, exceto apenas *B. subtilis*. Logo, segundo os autores, estes extratos possuem potencial como tratamento alternativo ou complementar para infecções bacterianas (MUDALIANA, 2021).

Zhao e colaboradores (2022) afirmaram que produtos naturais de plantas possuem atividade antibacteriana contra *S. aureus* através de diversos mecanismos de ação, incluindo atuação na parede celular bacteriana, via metabólica, ácido nucleico, biofilme e sistema *quorum sensing*. Outros estudos asseguram a importância de desenvolver novas opções terapêuticas contra isolados bacterianos MDR e patogênicos envolvidos em infecções (BOUYAHYA et al., 2022; dos SANTOS et al., 2022; JADIMURTHY et al., 2022; NOURBAKHSI, et al., 2022; ROCHA et al., 2022).

Estima-se, aproximadamente, mais de 350.000 espécies vegetais identificadas no mundo, sendo que um número superior a 20% se encontra no Brasil, e desse percentual, 4.000 espécies são reconhecidas como plantas medicinais. Logo, esse fator pode impulsionar o desenvolvimento de pesquisas sobre as atividades biológicas de espécies vegetais no Brasil (BRASIL, 2004; CATÃO et al., 2010; FORZZA et al., 2010).

O Brasil, considerado um dos países pioneiros nas Américas, através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), elaborou

critérios instituídos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para as abordagens de cuidado integral à população por meio de outras práticas, que envolvem recursos terapêuticos diversos, além de facilitar o acesso ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006a; MARMITT et al., 2015a; BOCCOLINI; BOCCOLINI, 2020; SILVA et al., 2020). Isso pode aprimorar estudos sobre extratos naturais, com a produção de fármacos com atividade antimicrobiana, principalmente pelo Brasil, por possuir a maior biodiversidade de plantas identificadas do mundo (FORZZA, et al. 2010).

Assim, é necessário determinar as atividades biológicas das fitomoléculas, sua composição química e o potencial farmacológico para produzir compostos com baixa toxicidade. Basicamente, estes compostos são utilizados devido, principalmente, ao baixo custo, à acessibilidade e ao potencial terapêutico dos medicamentos naturais (BUSH et al., 2014; CRESS et al., 2014; BOCCOLINI; BOCCOLINI, 2020).

No Brasil, Luna e colaboradores (2022) investigaram a composição química e inibição da formação de biofilme bacteriano pelo extrato aquoso de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz, encontrada na Caatinga (Brasil), e indicaram a presença de fitomoléculas, como flavonoides, taninos, proantocianidinas e leucoantocianidinas nas maiores concentrações, além da ação antibiofilme contra *S. aureus* nas concentrações entre 1.25 mg/mL e 2.5 mg/mL. Já no estudo realizado por Macedo e colaboradores (2022) com *L. ferrea*, não foi verificada ação antibacteriana, visto os valores de CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ em comparação à tetraciclina, como CIM de $64 \mu\text{g/mL}$.

2.1.1 Família Lauraceae

Lauraceae Juss. (Família Lauraceae), pertencente à ordem Laurales, junto com Calycanthaceae, Gomortegaceae, Hernandiaceae, Monimiaceae e Siparunaceae (APG III, 2009), é descrita como uma das mais primitivas famílias da Divisão Magnoliophyta, sendo composta por cerca de 52 gêneros e entre 2.500 e 3.000 espécies com distribuição pantropical, embora algumas sejam restritas às regiões subtropicais e poucas em latitudes temperadas (MADRINIÁN, 2004; LORENZI; SOUZA, 2008). No entanto, como a maioria dos gêneros não foi avistado nos últimos cem anos, o número exato de gêneros ainda é bastante discutido entre especialistas (ROHWER, 1993a, 1993b; van der WERFF; RICHTER, 1996).

Predominantemente, os espécimes da família Lauraceae habitam em florestas tropicais e subtropicais na América, Ásia, Austrália, Madagascar e África (ROHWER 1993a, van DER WERFF; RICHTER 1996; GARCEZ et al., 2009; dos SANTOS et al., 2011), apresentando-se como árvores e arbustos, exceto as espécies do gênero *Cassytha*, que são herbáceas hemiparasitas (QUINET et al., 2012).

Os primeiros registros sobre o uso da família Lauraceae datam de 2.800 a.C. através de documentos presentes na China, os quais descrevem o uso do óleo de *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl. (KOSTERMANS, 1952). Assim, além de sua relevância econômica em diversos segmentos, o conhecimento empírico para o uso tradicional aumentou sua disseminação e promoveu seu destaque entre as demais famílias (BAITELLO, 2001; MARQUES, 2001). Entre os gêneros economicamente importantes, há: *Litsea* com 400 espécies, *Ocotea* (300-400 espécies), *Cinnamomum* (250 espécies), *Cryptocarya* (200-250 espécies), *Persea* (150 espécies), *Lindera* (100 espécies), *Neolitsea* (80 espécies), *Aniba* (40 espécies) e *Laurus* (2 espécies) (RIZZINI, 1971; MARQUES, 2001).

Estudos afirmaram a relevância de Lauraceae entre as famílias vegetais que habitam na Mata Atlântica brasileira (MORI et al., 1983; OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000), incluindo *Persea americana* (abacate) e *Cinnamomum verum* (canela). A partir disso, Quinet e Andreatta (2002) descrevem um histórico dessa família desde as espécies descritas por Linnaeus no ano de 1753 até estudos realizados no ano de 1999, e posteriormente, outros estudos caracterizam a família Lauraceae (ROHWER, 2000; CHANDERBALI; van der WERFF; RENNER, 2001; CHANDERBALI, 2004; MADRIÑAN, 2004; ROHWER; RUDOLPH, 2005; van der WERFF, 2003).

No Brasil é encontrada a maior diversidade de espécies da família Lauraceae (MORAES, 2007), à qual está dispersa em 23 gêneros e 434 espécies, que habitam em sua maior parte nas florestas pluviais, especificamente em locais fitogeográficos, incluindo Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (QUINET, 2005), dos quais 18 gêneros e 125 espécies são encontrados no Nordeste brasileiro (ROHWER et al., 1993; QUINET et al. 2010; 2012).

Em território brasileiro, as espécies vegetais são amplamente referenciadas, devido às inúmeras utilizações, tais como: extração de óleos essenciais; obtenção de princípios ativos terapêuticos; reflorestamento; culinária e alimentos para animais;

inibição da germinação de sementes; repelente de insetos; e arborização da via urbana (KLEIN et al. 1979; MARQUES, 2001; SANTOS; ALVES, 2013).

A família Lauraceae destaca-se das demais famílias na área econômica, visto que algumas espécies são utilizadas nos seguintes setores: culinária (*P. americana*, *Persea gratissima*, *Laurus nobilis*), marcenaria (*Ocotea organensis*, *Aniba firmula*, *Aniba terminalis*), construção civil (*Ocotea acutifolia*, *Ocotea acyphylla*, *Ocotea catharinensis*), fabricação de papel (*Ocotea puberula*, *Ocotea elegans*), indústria de perfumaria e química (*Aniba roseadora*, *Aniba carnellita*, *Aniba parviflora*) e medicina popular (*Ocotea aciphylla*, *Ocotea spectabilis*, *Ocotea pulchella*, *Ocotea teleiandra*, *Laurus nobilis* e *Aniba riparia*) (MARQUES, 2001). Em contrapartida, essa importância econômica e a ausência de manejo florestal auxiliam à maior parte de suas espécies apresentarem risco de extinção (ARAÚJO, 1994).

Sendo importante destacar também, a obtenção de óleos essenciais de espécies da família Lauraceae (QUINET; ANDREATA, 2002) e a presença de uma classe de metabólitos secundários, conhecidos como alcaloides, que são moléculas produzidas principalmente em plantas e microrganismos, responsáveis por inúmeras atividades biológicas. Sua estrutura caracteriza-se por exibir um ou mais átomos de Nitrogênio, que certificam aspectos essencialmente básicos, sendo conhecidas mais de 27.000 estruturas distintas (DEWICK, 2009.; MINAMI et al., 2008); assim, aproximadamente 425 alcaloides são isolados e identificados em 189 espécies (CORDELL et al., 2001; YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; VEIGA-JUNIOR, 2012).

2.1.1.1 *Aniba riparia* (Nees) Mez. e *riparina* III

Sistematicamente, *A. riparia* (Nees) Mez. é descrita e identificada de acordo com a chave de identificação *Aniba Aubl., Hist. Pl. Guiane 1: 327. 1775* através das seguintes características (TABELA 1): Árvores ou arvoretas, monoicas. Folhas alternas, em geral com papilas na epiderme abaxial. Inflorescência geralmente panícula ou botríóide. Flores monoclinais, hipanto cupuliforme ou tubular, não comprimido abaixo das tépalas, seis tépalas eretas, iguais, face interna sem papilas. Androceu com nove estames férteis, filetes em geral da mesma largura que as anteras, anteras bilocelares: 1ª e 2ª séries com três estames cada, anteras introrsas ou extrorso-apicais; 3ª série com três estames, par de glândulas na base dos filetes, reduzidos, nunca fusionados, anteras extrosas; 4ª série estaminodial ausente ou raro

três estaminódios filiformes. Fruto bacáceo, elipsoide ou ovoide, envolvido parcialmente por cúpula de margem simples, hemisférica, lenhosa, tépalas decíduas (QUINET, 2005; BARBOSA; BAITELLO; MORAES, 2012; SANTOS; ALVES, 2013).

Tabela 1 - Descrição da classificação sistemática da espécie *Aniba riparia* (Nees) Mez.

Grupo	Classificação
Domínio	Eukarya
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Laurales
Família	Lauraceae
Gênero	<i>Aniba</i>
Espécie	<i>Aniba riparia</i>

O gênero *Aniba* apresenta cerca de 41 espécies de arbustos e árvores de planície distribuídas na América Central, Antilhas e, principalmente, na América do Sul, com o centro de biodiversidade das espécies encontrado na região das Guianas e Amazônia Central (FIGURA 1) (KUBITZKI; RENNER 1982; CASTELO-BRANCO et al., 2000). Na região Norte do Brasil, este gênero é representado por 25 espécies encontradas no Amazonas, Rondônia e Roraima (SILVA et al., 2015; ANIBA, 2017).

Figura 1 - Localização geográfica de espécimes de *Aniba riparia* (Nees) Mez. entre os anos de 1843 e 2021.



Termo	Interpretado	Original
Continente	SOUTH_AMERICA	Southern America
País ou área	Brazil	Brazil
Código do país	BR	
Latitude decimal	-2.883333	-2.883333
Longitude decimal	-59.966667	-59.966667
Datum geodésico	WGS84	WGS84
Estado/Província	Amazonas	Amazonas
Verbatim da elevação	0 m	0 m

Fonte: GBIF. Backbone Taxonomy *Aniba riparia* (Nees) Mez. (2021).

Deste gênero, a espécie mais importante é a *A. riparia* (Nees) Mez., à qual é popularmente conhecida como “louro”, “louro-faia” ou “pau-rosa” (BARBOSA et al., 1998; CASTELO-BRANCO et al., 2000; GARCEZ et al., 2009; MARQUES; AZEVEDO, 2011; QUINET et al., 2012; URBINATI et al., 2014) e apresenta características, 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) (FIGURA 2).

Figura 2 - Espécime de *Aniba riparia* (Nees) Mez. coletada no Brasil.



Fonte: ANIBA, *Aniba riparia* (Nees) Mez. Descrição U.1400663_01037097641, *Naturalis Biodiversity Center*. Identificador: <https://medialib.naturalis.nl/file/id/U.1400663/format/large>

Os metabólitos secundários estão presentes, principalmente, em plantas silvestres e proporcionam função protetora ao vegetal, sendo classificados em: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (CROTEAU et al., 2000). De tal modo, através de estudos sobre a composição química de *A. riparia* (Nees) Mez.,

especificamente, na casca do caule, foram identificadas fitomoléculas, como flavonoides, benzilbenzoatos e benzaldeídos (FERNANDES et al., 1978; FRANÇA et al., 1976). Posteriormente, a partir da análise das fitomoléculas do fruto verde e cálice (FIGURA 3) dessa espécie vegetal, foram obtidos inúmeros componentes orgânicos, incluindo neoglicanas, benzaldeídos, estirilpironas, feniletilaminas e alcaloides (BARBOSA-FILHO et al., 1987; CASTELO-BRANCO et al., 2000).

Figura 3 - Frutos verdes e folhas da espécie vegetal *Aniba riparia* (Nees) Mez.



Fonte: Bioweb.bio

Sabe-se que no grupo dos alcaloides são descritas as alcaloides, consideradas uma classe “especial” com um agrupamento funcional *amida*, restrita a poucos representantes na natureza (CATÃO et al., 2005) e originadas a partir da condensação de um ácido graxo insaturado e uma amina, configurando a alcaloide (HOFER et al., 1986). De tal modo, seguindo o processo de extração e purificação, podem ser obtidas

e isoladas três alcaloides naturais a partir da *A. riparia* (Nees) Mez., posteriormente sintetizadas em laboratório, às quais foram denominadas *riparinas* em homenagem à espécie vegetal: riparinas I, II e III (BARBOSA-FILHO et al., 1997).

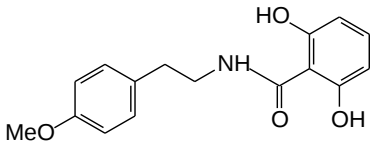
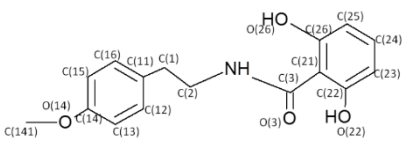
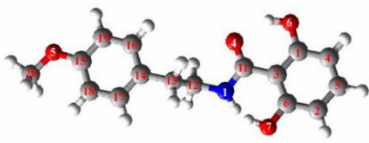
Uma das diferenças químicas observadas entre as riparinas I, II e III ocorre pela substituição de moléculas de hidrogênios no anel aromático por uma ou duas hidroxilas nas riparinas II e III, respectivamente (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Neste contexto, a riparina III é o principal componente molecular obtido da *A. riparia* (Nees) Mez., representando um total de 34% dos compostos extraídos (BARBOSA-FILHO et al., 1987).

No ano de 2005, Catão e colaboradores analisaram as riparinas (I, II e III) e determinaram que todas apresentam atividade antimicrobiana semelhante entre si contra cepas bacterianas MDR de *S. aureus* e *E. coli*. Já no ano de 2010, foram avaliadas as riparinas I, II e III contra frente cepas de *S. aureus*, sendo observada a presença de halos de inibição de crescimento bacteriano semelhantes, em média 9 mm, entre as riparinas analisadas (CATÃO et al., 2010).

Na investigação *in vitro* desenvolvida por Oliveira Júnior e colaboradores (2020) constatamos que entre as riparinas I, II e III, apenas a riparina III apresentou atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas padrão e isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*, ademais verificou-se um alto potencial de inibição da formação de biofilme, baixa toxicidade e percentual hemolítico, além de diversas alterações ultraestruturais induzidas nas espécies bacterianas, como: rompimento de parede celular, perda de material citoplasmático e morfologia bacteriana alterada.

A estrutura química da riparina III é conhecida como (*O*-Metil)-*N*-(2,6-Dihidroxibenzoil)-tiramina ou *N*-[8'-(4'-Metoxifeniletil)]-2,6-dihidroxi-benzoilamida (FIGURA 4), à qual posteriormente foi produzida sinteticamente em laboratório (BARBOSA-FILHO et al., 1987; BARBOSA-FILHO; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1990).

Figura 4 - Características químicas, fórmulas estruturais e moleculares da riparina III.

Nome	Classe Química	Fórmula Química	Solubilidade
Riparina III	Benzoil-Tiramina	$C_{16}H_{17}NO_4$	Cremonfor, DMSO, Tween 80
  			

Fonte: Barbosa-Filho et al., 1987; Marques et al., 2005; de Carvalho, et al., 2013.

O uso tradicional da *A. riparia* (Nees) Mez. não se encontra registrado na literatura; porém, as atividades biológicas *in vitro* foram demonstradas. Sendo assim, a riparina III apresenta atividades: espasmolítica (CASTELO-BRANCO et al., 1991; THOMAS et al., 1994), antimalárica, esquistossomicida e moluscicida (CASTELO-BRANCO, 1992), relaxante muscular (THOMAS et al., 1994), antimicrobiana (BARBOSA-FILHO et al., 1987; BARBOSA et al., 1988; CATÃO et al., 2005; 2010; OLIVEIRA JÚNIOR, 2020), ansiolítica (MELO et al., 2006), antidepressiva (MELO et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2015) e antibiofilme (OLIVEIRA JÚNIOR, 2020).

Há poucos estudos disponíveis na literatura sobre a ação antimicrobiana da riparina III. Pode ser relatada a atividade antimicrobiana de compostos obtidos da *A. riparia* (Nees) Mez., inclusive a riparina III, contra cepas microbianas, como *S. aureus*, *B. cereus* e *Candida albicans*, sendo descrita uma baixa atividade antimicrobiana contra cepas bacterianas: *E. coli*, *Proteus* sp. e *K. pneumoniae* (BARBOSA et al., 1988; MARQUES, 2001). Outros estudos confirmam a atividade antimicrobiana da riparina III contra cepas MDR de *S. aureus* e *E. coli* (CATÃO et al., 2005; 2010) e isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii* (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2020).

Assim, é necessário investir e estimular o desenvolvimento, a médio e longo prazo, de novas fitomoléculas com atividade antimicrobiana, à base de produtos naturais e seus derivados, indicadas para o tratamento de indivíduos com infecções

potencialmente fatais causadas pela disseminação e proliferação de patógenos bacterianos MDR (MIETHKE et al., 2021; STAN et al., 2021). Um fator eminente para tal é a diminuição absurda de antimicrobianos eficazes contra infecções bacterianas (CRESS et al., 2014), tornando necessária a análise de substâncias mais potentes e menos tóxicas com espectro bactericida.

2.2 INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Uma das principais preocupações mundiais no âmbito da saúde, são as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), definidas como uma infecção adquirida após o paciente ser submetido a um procedimento de assistência à saúde ou a internação (BRASIL, 1998; ANVISA, 2021), e responsáveis pela incapacitação ou morte de pacientes em ambiente hospitalar e comunidade (SANTAJIT & INDRAWATTANA, 2016), promovendo altos custos aos pacientes e ao Governo de países com baixa ou média renda (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; KAYE; GALES; DUBOURG, 2017; ASLAM et al., 2018; CAVALCANTE et al., 2019; WHO, 2021b).

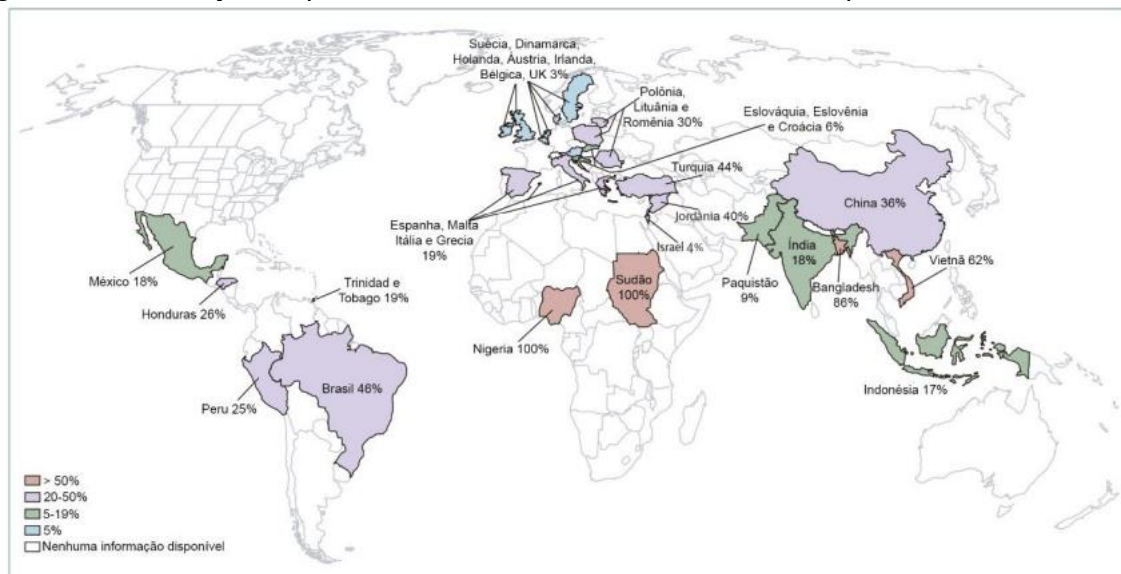
As IRAS são descritas como um importante problema de saúde pública, devido ao impacto significativo na morbimortalidade e qualidade de vida dos pacientes e ao alto custo nos sistemas de saúde no mundo (PURO et al., 2022); contudo, a maioria das IRAS são evitáveis e podem ser reduzidas em até 70% através de medidas efetivas de Controle e Prevenção de Infecções (UMSCHEID et al. 2011). De tal forma, os antimicrobianos estão entre os medicamentos mais comumente adquiridos no mundo (COL; O'CONNOR, 1987), considerados essencialmente importantes para o sucesso terapêutico, evitando o prolongamento da infecção no paciente e/ou o óbito (WHO, 2021b).

Durante a internação, estima-se que 25 a 35% dos pacientes fazem uso de antimicrobianos prescritos pela equipe clínica (CARDINAL et al., 2012; ATIF et al., 2017), e de acordo com a OMS, mais de 50% das prescrições de antimicrobianos são consideradas inadequadas (ZAMAN et al., 2017). Em seu estudo, Morgan et al. (2011) analisaram o uso indiscriminado de antimicrobianos e revelaram o real problema de saúde pública em trinta e cinco países, ressaltando um elevado índice do uso nos cinco continentes (FIGURA 5) (MORGAN et al., 2011).

Em consequência, inúmeras espécies microbianas estão envolvidas em infecções persistentes e recorrentes, incluindo *S. aureus* e *A. baumannii*, devido aos seus mecanismos de resistência aos antimicrobianos (ZHU; HUANG; YANG, 2022) e fatores de virulência, dificultando o tratamento de infecções, visto a diminuição da eficácia e a toxicidade descrita nos antimicrobianos disponíveis (SANTAJIT;

INDRAWATTANA, 2016; DI DOMENICO et al., 2017; RENNER et al., 2017; WHO, 2017; ASLAM et al., 2018).

Figura 5 - Distribuição de percentual do uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos.



Legenda: Na cor marrom, são os países que apresentam mais de 50% de uso de antimicrobianos; em roxo, são países com uso entre 20 a 50%; em verde, os países entre 5 a 19%; e em azul, países com menos de 5%. As áreas em branco não possuem dados disponíveis.

Fonte: Adaptado de Morgan et al., 2011.

Estima-se que nos Estados Unidos da América (EUA) mais de 70% das cepas bacterianas obtidas em pacientes internados possuem resistência a pelo menos um antimicrobiano comumente utilizado na terapia (SALES et al., 2014). Baseado na resistência aos antimicrobianos, as cepas podem ser classificadas em: multidroga-resistentes (MDR – *Multidrug-resistant*), àquelas que apresentam resistência *in vitro* a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos; extensivamente droga-resistentes (XDR - *Extensively drug-resistant*), àqueles microrganismos resistentes a pelo menos um agente antimicrobianos em todas as classes de antimicrobianos, exceto duas ou menos; e pandroga-resistentes (PDR - *Pan drug-resistant*), definidos como resistentes a todos os agentes antimicrobianos em todas as classes (MAGIORAKOS et al., 2012; ANVISA, 2010; 2021).

Dados da Sociedade de Doenças Infecciosas da América (*Infectious Diseases Society of America* - IDSA) e da OMS apresentam inúmeras espécies bacterianas envolvidos em IRAS com altos níveis de resistência a diversas classes de antimicrobianos e fatores de virulência, incluindo Enterobacterales, *S. aureus*, *P.*

aeruginosa, *A. baumannii*, entre outras (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; SUBRAMANI; NARAYANASAMY; FEUSSNER, 2017; RENNER et al., 2017; WHO, 2017; ASLAM et al., 2018; de OLIVEIRA et al., 2020; WHO, 2021b).

De tal forma, estes fatores de resistência e virulência dificultam o tratamento de pacientes com infecções, visto a diminuição da eficácia e a toxicidade de antimicrobianos disponíveis, além de promover impactos negativos nas instituições de saúde, profissionais e pacientes (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; SOUSA et al., 2016; DI DOMENICO et al., 2017; KAYE; GALES; DUBOURG, 2017; RENNER et al., 2017; WHO, 2017; ASLAM et al., 2018).

Em particular, *S. aureus* e *A. baumannii* estão entre as principais espécies bacterianas responsáveis por IRAS adquiridas em hospitais e comunidades no mundo, além de uma ameaça significativa à saúde humana (CHEN et al., 2019; WONGSURAKIAT; CHITWARAKORN, 2019; DABAJA-YOUNIS et al., 2020), sendo consideradas duas das seis 'superbactérias' que compõem o grupo ESKAPEE (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *E. coli*), e foram recentemente designadas, respectivamente, como categoria 2 (alta) e 1 (crítica) de patógenos prioritários resistentes aos antimicrobianos (OMS, 2017; MULANI et al., 2019; de OLIVEIRA et al., 2020; RUEKIT et al., 2022).

Assim, as mutações genéticas e a aquisição de plasmídeos associados à patogênese e resistência antimicrobiana do grupo ESKAPEE pode propiciar sua sobrevivência à ação de agentes biocidas, como os antimicrobianos (de OLIVEIRA et al., 2020; RUEKIT et al., 2022). Logo, constata-se que este grupo, frequentemente, tem desenvolvido resistência aos antimicrobianos disponíveis, principalmente os glicopeptídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas, bem como β -lactâmicos (PEETERS et al., 2019).

O aumento de IRAS promoveu implicações nos gastos hospitalares. No Reino Unido, um estudo realizado no ano de 2000 descreve que as IRAS provocaram 5.000 óbitos e um aumento de 1% no orçamento total de um hospital (WAITE et al., 2016). Já na Alemanha, estima-se que aproximadamente 2.4 bilhões de euros sejam gastos anualmente para o tratamento de tais infecções (FRANK et al., 2003).

Apesar dos dados alarmantes, as IRAS ainda permanecem subestimadas no Brasil; ademais, pode haver uma variação entre informações, visto à ausência de um

banco de dados epidemiológicos padronizados sobre IRAS no Brasil (SOUSA et al., 2016). No ano de 2022, foi elaborado um relatório com dados das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) de Pernambuco obtidos entre os anos de 2012 a 2021, o qual apontou a alta prevalência de infecções envolvendo *E. coli*, *Staphylococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* em pacientes adultos, pediátricos e neonatais internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (ANVISA, 2022).

Entre os setores hospitalares, a UTI é o setor de maior incidência das IRAS, uma vez que o paciente está bastante propenso a adquirir infecções, em virtude de sua condição clínica e o uso de procedimentos invasivos. Assim, estes pacientes possuem entre 5 e 10 vezes maior probabilidade em aquisição de IRAS, representando cerca de 20% do total das infecções em um hospital (SALES et al., 2014; SOUSA et al., 2016). No estudo realizado por Hamam e colaboradores (2021), foi possível confirmar estes dados ao analisar as UTIs em hospitais universitários, revelando que 34.4% dos pacientes são acometidos por pneumonia associada à ventilação (PAV), seguida por infecção de corrente sanguínea (33.1%), infecção de sítio cirúrgico (19.1%) e de trato urinário (13%).

2.2.1 Espécies bacterianas de importância médica

2.2.1.1 *Acinetobacter baumannii*

O complexo *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* compreende um grupo bacteriano composto por *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* e *A. nosocomialis*, descritas como as espécies mais frequentemente obtidas com interesse médico (HSIEHET al., 2014; ZENG et al., 2020), tendo *A. baumannii* emergindo como um importante patógeno oportunista associado à assistência à saúde.

A espécie *A. baumannii* é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família Moraxellaceae, à qual apresenta morfologia de cocobacilos, não fastidiosa, catalase positiva, oxidase e motilidade negativas, estritamente aeróbica, não fermentadoras de glicose, imóvel com bom crescimento a 20-30°C. Habitualmente, é uma espécie ubíqua e origem hospitalar (LIN; LAN, 2014; FUJIKURA et al., 2016; AHMED et al., 2019; BALKHAIR et al., 2019; SNYMAN et al., 2020; IBRAHIM et al., 2021), com fácil

adaptação em ambientes secos e hostis, devido à habilidade em obter fonte de carbono para o seu desenvolvimento (FIGURA 6).

Figura 6 - Colônias de *Acinetobacter baumannii* cultivadas em ágar MacConkey.



Fonte: American Society for Microbiology (2005).
<http://www.202.195.144.50/ASM/112-Introduce2.htm>
(Imagem acessada em 15/07/2021).

Pode ser um patógeno oportunista em ambiente hospitalar, além de colonizar a pele, a orofaringe e o trato gastrointestinal sem causar infecções (MARAGAKIS; PERL, 2008); porém, em pacientes imunocomprometidos, particularmente pacientes admitidos em UTI, esta espécie está associada às IRAS, incluindo a PAV, conforme relatada desde a década de 1970 (GLEW; MOELLERING; KUNZ, 1977), sendo a infecção mais comum causada por *A. baumannii*.

Outras infecções estão associadas a essa espécie bacteriana, como: infecções no sistema nervoso central, pele, tecidos moles, ossos, endocardite, meningite secundária e infecções da corrente sanguínea, do trato urinário e de feridas cirúrgicas (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Além disso, *A. baumannii* está envolvida em infecções que ocorrem por meio da contaminação de equipamentos hospitalares com disseminação clonal, bem como através do tempo prolongado de internação, promovendo alto custo e alta taxa de mortalidade (YOUNG et al., 2007; GISKE et al.,

2008; BIGOT; SALCEDO, 2017; FAM et al., 2017; ROBERTS et al., 2017; LIMA et al., 2020; MOUBARECK; HALAT, 2020; SNYMAN et al., 2020; ZHENG et al., 2020).

Por se tratar de um microrganismo considerado um problema à saúde humana, diversos centros de pesquisas, incluindo a OMS, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention* - CDC) e a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (*Infectious Diseases Society of America* - IDSA), mencionam que *A. baumannii* foi elevado do nível de ameaça *grave* para ameaça *urgente* no ano de 2017 (TACCONELLI et al., 2017; WHO, 2017; RELLO et al., 2018; CDC, 2019; CHEN et al., 2019; WONGSURAKIAT; CHITWARAKORN, 2019; de OLIVEIRA et al., 2020).

A incidência de *A. baumannii* é bastante elevada (SPELLBERG; REX, 2013; ZILBERBERG et al., 2016), devido aos mecanismos de resistência, incluindo enzimas, bombas de efluxo, modificação de aminoglicosídeos, defeitos de permeabilidade e alteração do sítio de ligação (LEE et al., 2017) e fatores de virulência, além da capacidade de sobreviver em condições hostis em ambientes hospitalares, promovendo o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos e surtos hospitalares, limitando assim as opções terapêuticas (MEA; YONG; WONG, 2021).

Estes fatores podem ser agravados pelo uso inadequado e indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, provocando um aumento bastante significativo de linhagens com fenótipo MDR ou PDR (VIEIRA; PICOLI, 2015; LEE et al., 2016; ZILBERBERG et al., 2016; SNYMAN et al., 2020). No Brasil implica ainda a escassez de dados epidemiológicos a respeito de IRAS envolvendo *A. baumannii* (ROCHA et al., 2015; VIEIRA; PICOLI, 2015).

Estudos realizados em diversos países relatam a importância de *A. baumannii* em pacientes infectados em UTI, visto a alta taxa de mortalidade - estimada entre 45 a 60% - podendo aumentar para mais de 80% quando há cepas XDR entre esses patógenos (INCHAI et al., 2015; ROCHA et al., 2015; LEE et al., 2016; UWINGABIYE et al., 2016; ZILBERBERG et al., 2016; de SÁ CAVALCANTI et al., 2017; DJORDJEVIC et al., 2017; KANODIA et al., 2017; TANG et al., 2017).

Assim, as infecções acometidas por *A. baumannii* permanecem uma grande preocupação mundial, visto a ampla resistência aos antimicrobianos e alta taxa de mortalidade, tendo os pacientes com baixa função imunológica, hospitalizados e vulneráveis admitidos em UTI como os mais propensos a serem colonizados ou

infectados por essa espécie bacteriana (DEHBALAEI et al., 2017; AL-KADMY et al., 2018; ZHAO et al., 2019; SNYMAN et al., 2020).

2.2.1.1.1 Resistência antimicrobiana por *Acinetobacter baumannii*

O isolamento constante de cepas de *A. baumannii* resistentes aos antimicrobianos tem sido responsável pela impossibilidade do tratamento apropriado (MARAGAKIS; PERL, 2008; IBRAHIM et al., 2021). Os antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, como gentamicina, ampicacina, são ótimas opção terapêutica contra IRAS causadas por *A. baumannii* (OLIVEIRA et al., 2006; ANVISA, 2020), além dos carbapenêmicos, que são considerados os mais seguros e eficazes (ARROYO et al., 2011; BREILH et al., 2013; VOULGARI et al., 2013; FAM et al., 2017), representando uma das últimas opções terapêuticas para o tratamento de infecções por *A. baumannii* MDR (SNYMAN et al., 2020).

A resistência aos carbapenêmicos tem reduzido absurdamente as opções terapêuticas (ZARRILLI et al., 2009; BREILH et al., 2013; VOULGARI et al., 2013; FAM et al., 2017), o que impulsionou a utilização de colistina como última opção terapêutica para combater infecções por *A. baumannii* MDR (DOI et al., 2015; LEE et al., 2017; ZHANG et al., 2017; CHOU et al., 2019; AL-KADMY et al., 2020; ZHENG et al., 2020); no entanto, também tornou-se ineficiente, devido à resistência a esse antimicrobiano (KONTOPOULOU et al., 2010; CAI et al., 2012; SPANU et al., 2012; ASIF et al., 2018; SNYMAN et al., 2020). Na busca de uma alternativa terapêutica, a concentração de colistina foi aumentada em combinação a tigeciclina (LEE et al., 2009), mesmo assim, a terapia combinada ainda não funcionou de forma eficaz (LEE et al., 2013; SHIELDS et al., 2012).

Em um estudo realizado com 912 isolados bacterianos Gram-negativos obtidos de diversas amostras biológicas de pacientes internados em um hospital terciário na Índia, indicou que a prevalência de *Acinetobacter* spp. foi em 15.5% e o perfil de resistência aos antimicrobianos em MDR, XDR e PDR foi 71.63%, 50.35% e 2.84%, respectivamente (PATTNAIK et al., 2019).

No ano de 2019, Gales e colaboradores avaliando a frequência e os padrões de suscetibilidade antimicrobiana e as mudanças ao longo do tempo nos padrões de suscetibilidade de 13.752 isolados da coleção de cepas do complexo *A. calcoaceticus*-

A. baumannii e *Stenotrophomonas maltophilia* do Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY (1997 e 2016), observaram que 56.2% foram resistentes ao meropenem e 2.5% apresentaram resistência à colistina (GALES et al., 2019). No mesmo ano, Azevedo e colaboradores investigando a diversidade genética, perfis de resistência e prevalência de genes de resistência antimicrobiana em *A. baumannii* em hospitais de Mato Grosso/Brasil, observaram que dos 87 isolados, 91.9% exibiram resistência ao imipenem e 98.8% foram sensíveis à colistina (AZEVEDO et al., 2019).

No ano de 2020, Nodari e colaboradores caracterizaram os mecanismos de resistência aos antimicrobianos de isolados clínicos de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos de hospitais brasileiros, sendo observado que todos apresentavam resistência ao meropenem e 72% à colistina (NODARI et al., 2020). Outro estudo confirmou isolados de *A. baumannii* resistentes à colistina na Cidade do Cabo, África do Sul, em pacientes internados em um hospital terciário (SNYMAN et al., 2020).

No Brasil, no ano de 2021, a taxa de resistência de *A. baumannii* aos carbapenêmicos apresentou um percentual de até 79% (ANVISA, 2021). No mesmo ano, outro estudo analisou pacientes em UTIs de hospitais universitários no Egito entre 2016 e 2018, revelando a presença de *A. baumannii* em 7.4% das IRAS (HAMAM et al., 2021). Em Modena, na Itália, foram identificados os principais fatores de riscos associados à colonização nosocomial retal de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (MESCHIARI et al., 2021) e um estudo visando avaliar o papel de *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos em causar pneumonia em pacientes na UTI, no Egito, observou que 124 isolados clínicos (124/165; 75.2%) eram Gram-negativos, sendo *A. baumannii* um dos mais frequentes (54/165; 32.7%), os quais exibiram suscetibilidade à colistina e resistência ao imipenem (KHALIL et al., 2021).

Em estudo com 255 isolados coletados de 187 pacientes queimados para avaliar as manifestações clínicas, resistência antimicrobiana, características moleculares e fatores de risco para infecção por patógenos do grupo ESKAPEE em pacientes queimados na China, foi observado que 133 isolados (52.2%) foram bactérias Gram-negativas, sendo *A. baumannii* a espécie mais incidente (21.1%), seguida por *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *E. coli* e *K. pneumoniae* (LI et al., 2021).

Também em avaliação em UTIs de quatro hospitais universitários do Egito foi descrito a presença de 96.4% dos isolados Gram-negativos, incluindo *A. baumannii* como MDR (HAMAM et al., 2021). Através de análise bacteriológica em pacientes com

Covid-19 no México foram obtidos os isolados bacterianos causadores de PAV e o perfil clonal de *A. baumannii*. Revelou-se que 56.3% dos aspirados traqueais apresentaram crescimento bacteriano significativo, sendo 60 isolados Gram-negativos e 23 isolados Gram-positivos. Os resultados mostraram também que todas as cepas de *A. baumannii* (26.4%) exibiram sensibilidade à colistina e resistência à meropenem (92.9%) (LOYOLA-CRUZ et al., 2022).

Um estudo avaliando a taxa de IRAS, a frequência de patógenos e os padrões de resistência antimicrobiana de 732 isolados bacterianos, na Turquia, entre os anos de 2015 e 2019, observou-se a resistência aos carbapenêmicos em 95.1% entre os isolados de *A. baumannii* e à colistina em 2.4% (ERDEM et al., 2022). No mesmo ano, em seu estudo realizado na Jordânia, Al-Tamimi e colaboradores (2022) analisaram 622 isolados clínicos de *A. baumannii*, dos quais 76.8% eram MDR e 99.2% eram resistentes aos carbapenêmicos.

2.2.1.2 Staphylococcus aureus

A bactéria *S. aureus* (FIGURA 7) compõe a família Micrococcaceae, sendo definida como cocos Gram-positivos, geralmente dispostos em agregados irregulares, em aglomerados/arranjos (o nome é derivado do grego *staphylé*¹, aglomerado), caracterizados como imóveis, produtores de catalase, em sua maioria fermentadores de manitol, aeróbios-anaeróbios facultativos, halofílicos, não esporulados, geralmente não encapsulados, e produtores de hemólise (OGSTON, 1882; ANVISA, 2013).

¹ Ogston, Alexander. *Micrococcus poisoning*. Journal of Anatomy and Physiology. 17(Pt 1):24-58. 1882.

Figura 7 - *Staphylococcus aureus* cultivado em ágar manitol salgado.



Fonte: American Society for Microbiology (2014).
<http://www.microbelibrary.org/>
(Imagem acessada em 15/07/2021).

Normalmente, é uma bactéria comensal, que coloniza a pele e as mucosas de animais, incluindo humanos saudáveis, em aproximadamente 30% da população humana (WERTHEIM et al., 2005), e um patógeno humano com grande capacidade de sobreviver em condições hostis ou mudanças bruscas de temperatura; no entanto, são considerados responsáveis por altas taxas de IRAS em pacientes hospitalizados, apresentando elevada incidência em infecção na corrente sanguínea, meningite, pericardite, endocardite, bacteremia, síndrome do choque tóxico, infecções osteoarticulares, de pele e tecidos moles, pleuropulmonares e relacionadas a dispositivos (HOWDEN et al., 2010; MALACHOWA; DELEO, 2010; COATES; MORAN; HORSBURGH, 2014; STRYJEWSKI; COREY, 2014; ROMÃO et al., 2016).

Entre os patógenos Gram-positivos, há uma elevada frequência de *S. aureus* em IRAS, que varia entre 15.5% e 68.79% no Brasil (MARQUES; CARNEIRO; FERREIRA, 2011; SOUSA et al. 2016), sendo apontado como uma das espécies bacterianas relacionadas aos altos índices de morbimortalidade (SOUSA et al. 2016; LEE et al., 2018). Isso tornando-se um grave problema visto sua rapidez em adquirir

resistência aos antimicrobianos, configurando-o como um patógeno emergente com disseminação de fenótipo MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina) e resultando em complicações graves decorrentes do uso indiscriminado de antimicrobianos (GOULART, et. al., 2015; CAMILO; PEDER; SILVA, 2016; ROMÃO et al., 2016). No Brasil, entretanto, não há dados sistematizados que apontem as taxas de colonização por MRSA na população em geral, apenas em grupos específicos: pacientes atendidos em ambulatório de dermatologia (OLIVEIRA; PAULA, 2012).

Durante uma década, Rodrígues-Rubio e colaboradores (2013) averiguaram a tendência dos principais isolados bacterianos MDR, tipos/origens das infecções e relação entre a infecção e admissão na UTI de um hospital universitário em São José do Rio Preto/São Paulo. No período, 53.316 bactérias foram isoladas, entre as quais, 21.066 foram descritas como Gram-positivas e alta prevalência de *S. aureus* (8345; 47.5%). Nestes resultados, os autores descreveram que a resistência de *S. aureus* permaneceu relativamente estável ao longo do período.

No estudo realizado por Ramirez-Blanco e colaboradores (2017) na Colômbia, entre os isolados Gram-positivos, *S. aureus* foi o mais recorrente em infecções da corrente sanguínea (16.1%), queimaduras (7.7%), pneumonia (8.3%) e infecções em cateter venoso central em 18.8% dos 402 pacientes queimados hospitalizados. Já no estudo de Djordjevic e colaboradores (2017), foi possível confirmar estes dados ao observar *S. aureus* como o patógeno Gram-positivo mais frequente em PAV nos 850 pacientes admitidos em UTI na Sérvia.

Outro estudo relatou a presença de *S. aureus* (23.07%) em amostras de secreção traqueobrônquica de pacientes com PAV em Maringá/Paraná (FERREIRA et al., 2017) e Kanodia e colaboradores (2017) determinaram o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados obtidos de hemoculturas de pacientes neonatais no Nepal, sendo observada a presença de patógenos Gram-positivos em 71% dos casos, sendo *S. aureus* (53.2%) a espécie mais frequente.

Weiner-Lastinger e colaboradores (2020) analisaram um total de 311.897 IRAS e 356.633 patógenos notificados, e seus padrões de resistência aos antimicrobianos durante os anos de 2015 a 2017 da Rede Nacional de Segurança em Saúde do CDC, sendo observada a presença de *S. aureus* (42.132;11.8%), como o segundo patógeno mais relatado. No ano seguinte, um estudo realizado na China analisou os fatores

relacionados à infecção bacteriana múltipla em 1012 idosos com PAV, indicando *S. aureus* como mais recorrente nas infecções (ZHAOYUM et al., 2021). Outro estudo observou culturas de *S. aureus* (108/18.5%), sendo 90% descritos como MRSA e 86% eram isolados clínicos MDR (HAMAM et al., 2021).

Silva e colaboradores (2022) buscaram a prevalência de fatores relacionados às IRAS causadas por isolados bacterianos MDR em UTI pediátrica em São Paulo/SP, sendo possível determinar que o estado imunocomprometido é um fator relacionado às IRAS, nas quais houve maiores taxas de isolados Gram-positivos, incluindo *S. aureus*, e *Staphylococcus* coagulase-negativos. No mesmo ano, na Turquia, Erdem e colaboradores indicaram que das 271 cepas Gram-positivas, 5.8% foram identificadas como *S. aureus*. E verificando as características de resistência antimicrobiana de patógenos bacterianos associados às infecções de corrente sanguínea na China, Wang e colaboradores (2022) observaram *Staphylococcus* coagulase-negativos (40.23%) e *S. aureus* (5.15 %) entre as espécies mais frequentes.

2.2.1.2.1 Resistência antimicrobiana por *Staphylococcus aureus*

Para evadir o sistema imunológico, *S. aureus* desenvolveu mecanismos de resistência e fatores de virulência, promovendo altos índices de morbimortalidade em pacientes com IRAS, e adaptabilidade em diferentes ambientes hostis (LIMA et al., 2015; SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; RENNER et al., 2017; WHO, 2017), devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos (GUO et al., 2020).

O desenvolvimento e uso de penicilina e meticilina em meados do século XX exibiram, inicialmente, eficácia contra *S. aureus*; contudo, rapidamente esta espécie adquiriu resistência a esses antimicrobianos, tornando bastante difícil a terapêutica. Apesar do progresso, MRSA continua sendo uma ameaça significativa para a saúde humana no mundo. Por exemplo, os isolados de *S. aureus* representam 29% de todos os isolados bacterianos relatados na Europa, e cerca de 72.444 casos de infecções invasivas por MRSA ocorreram nos EUA no ano de 2014 (CDC, 2014).

Um levantamento realizado em 11 países da América Latina determinou que 48.3% dos isolados clínicos de *S. aureus* exibiram o fenótipo MRSA (ROSSI et al., 2008) e no Brasil, cepas MRSA têm-se tornado mais incidente, variando entre 26.6 e 80% (ANVISA, 2013; MACIEL; CÂNDIDO, 2013). A importância de *S. aureus* pode

ser confirmada por Weiner-Lastinger e colaboradores (2021), ao relatarem a espécie bacteriana como segunda posição (11.8%) do total de 356.633 patógenos identificados entre os anos de 2015 e 2017. Outro estudo bastante amplo corrobora os dados anteriores ao publicar uma revisão sobre surtos de IRAS na África entre os anos de 2009 e 2018, indicando um total de 31 patógenos, incluindo *K. pneumoniae* e *S. aureus*, ambos com 19% dos casos (FRASER et al., 2021).

No ano de 2016 foi descrito o perfil de resistência aos antimicrobianos de *S. aureus* envolvidos em IRAS. As cepas exibiram resistência, principalmente, em 83.3% para eritromicina e oxacilina; 90.9% para cefazolina, cefuroxima, gentamicina, linezolida e rifampicina; e em 100% para daptomicina, levofloxacina, nitrofurantonina e sulfametoxazol/trimetoprim (RAMIREZ-BLANCO et al., 2017). No estudo realizado por Kanodia e colaboradores (2017), ao determinarem o perfil e padrões de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de hemoculturas de neonatais no Nepal, *S. aureus* foi a espécie mais frequente (53.2%), sendo resistentes à ampicilina (59%), ciprofloxacina (28%), gentamicina (19%) e meticilina (16%).

Segundo Singh e colaboradores (2017), as cepas de *S. aureus* obtidas das 818 amostras de feridas de pacientes admitidos nos setores de queimados na UTI em Delhi/Índia exibiram ampla resistência aos antimicrobianos testados: eritromicina (91%) e ciprofloxacina (90%), e um aumento significativo na resistência à cefoxitina, variando de 77.4% para 94%. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Sharma e colaboradores (2017), ao analisarem o perfil de resistência de *S. aureus*, notando altas taxas de resistência: ceftriaxona (95%), ceftazidima (92%), cefuroxima (82,9%) e cefoperazona/sulbactam (68,6%).

Um estudo realizado no Egito entre os anos de 2016 e 2018 analisou as UTIs em quatro hospitais universitários, revelando *S. aureus* (18.5%) e *Staphylococcus coagulase-negativa* (3.7%) como os Gram-positivos mais recorrentes nas IRAS, sendo que, entre estes isolados, 90% eram MRSA e 86% descritos com fenótipo MDR (HAMAM et al., 2021).

Li e colaboradores (2021) determinaram as manifestações clínicas, resistência antimicrobiana, características moleculares e fatores de risco para infecção por patógenos do grupo ESKAPEE em pacientes queimados. Um total de 255 isolados foram coletados de 187 pacientes queimados, sendo 122 (47.8%) bactérias Gram-positivas, tendo *S. aureus* (28.7%, 35/122) como mais recorrentes.

Um estudo retrospectivo de vigilância (2012-2017) realizado na China em pacientes no setor de ortopedia obteve 1.392 patógenos, dos quais 399 (28.7%) eram Gram-positivos. Neste período, *S. aureus* foi o patógeno Gram-positivo mais comum entre as infecções (11.3%, 157), exibindo isolados clínicos resistentes à penicilina (90.9-100%), ampicilina (100%) e mais da metade dos isolados resistentes à oxacilina, ceftriaxona e eritromicina; contudo, nenhuma resistente à nitrofurantoína, linezolida e vancomicina (YANG et al., 2021).

Erdem e colaboradores (2022) realizaram um estudo retrospectivo das IRAS em um hospital universitário entre os anos de 2015 e 2019 na Turquia. Das cepas identificadas como *S. aureus* foi observada resistência à meticilina em 31.7% das cepas e todas sensíveis à vancomicina e linezolida. Wang e colaboradores (2022) desenvolveram um estudo de revisão sobre as características e o perfil de resistência antimicrobiana de patógenos associados às infecções de corrente sanguínea em recém-nascidos na China. Os autores citam as cepas de *S. aureus* como altamente resistentes à eritromicina e penicilina, tendo como antimicrobianos mais eficazes: vancomicina, ciprofloxacina, gentamicina, linezolida, rifampicina e tetraciclina.

No Egito, o estudo de Alfeky e colaboradores (2022) identificou alta prevalência de isolados de MRSA (81.2%) com 79% dos isolados sendo MDR-MRSA, além de resistência à diversas classes de antimicrobianos, incluindo β -lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos, sendo a maior taxa de resistência à cefoxitina e penicilina (100%). No mesmo ano, dos 398 pacientes internados na Índia, 55 patógenos clínicos foram isolados, dos quais 25 (45.45%) eram espécies Gram-positivas, sendo 58% detectados como MRSA (MAINDAD et al., 2022). No mesmo país, o estudo de Rasmi e colaboradores (2022) detectaram 59 isolados de *S. aureus* em 51 amostras de feridas, dos quais o fenótipo MRSA representou 91.5% dos isolados clínicos e 54.2% exibiram o perfil MDR com alto padrão de resistência à oxacilina e piperacilina.

2.3 PRODUTOS NATURAIS DE ORIGEM VEGETAL ASSOCIADOS AOS ANTIMICROBIANOS

As espécies vegetais possuem metabólitos secundários, os quais apresentam propriedades biológicas contra isolados bacterianos MDR envolvidos em infecções

em animais, incluindo os humanos (MARMITT et al., 2015b; BARBIERI et al., 2017). A expressiva identificação de isolados bacterianos MDR, que limitam a terapêutica (MARMITT et al., 2015b), tornam as infecções como persistentes, aumentando o risco de resultados clínicos ruins ou óbito (WHO, 2021a).

Para tal aspecto, diversos países vêm analisando e utilizando produtos naturais em pacientes acometidos com IRAS (BAKAL et al., 2017; ELISHA et al., 2017; VAN VUUREN; HOLL, 2017; MARCHESE et al., 2018). Entretanto, o uso desses produtos de origem vegetal para fins terapêuticos ainda é considerado restrito (SUBRAMANI; NARAYANASAMY; FEUSSNER, 2017).

Para o desenvolvimento de um medicamento com ação antimicrobiana há um custo bastante elevado, bem como é um processo dispendioso, levando em torno de dez anos para disponibilizá-lo na prática clínica. Além disso, é comprovado que a maioria dos antimicrobianos provoca efeitos adversos nos pacientes (van VUUREN, 2008; UDEGBUNAM et al., 2014), como síndrome de Stevens-Johnson e necrólise epidérmica tóxica, além de reações de hipersensibilidade associadas à sulfonamidas, fluoroquinolonas e penicilina (FERRANDIZ-PULIDO; GARCIA-PATOS, 2013; PATEL et al., 2013).

É importante ressaltar que infecções acometidas por isolados bacterianos Gram-negativas com fenótipo MDR são mais graves (ELEMAM; RAHIMIAN; DOYMAZ, 2010). Por consequência, a busca por substâncias derivadas de produtos naturais com ação antimicrobiana para tais infecções, adquiriu relevante na pesquisa clínica (MANDAL et al., 2014; ANYANWU; OKOYE, 2017; BARBIERI et al., 2017).

Sabe-se que inúmeras fitomoléculas exibem atividades biológicas, incluindo a ação antimicrobiana; contudo, em algumas situações, essa ação é considerada fraca e seu espectro de ação limitado, quando utilizadas isoladamente. Assim, o uso de produtos naturais em combinação aos antimicrobianos convencionais pode alterar o perfil de sensibilidade e diminuir a dose necessária à eficácia terapêutica (SIMÕES; BENNETT; ROSA, 2009; OKOLI et al., 2009; TIJANI; SALLAU; SUNUSI, 2011; OFOKANSI et al., 2013; FAROOQUI et al., 2015). Basicamente, estas combinações podem ser determinadas através do método de *Checkerboard*, sendo classificadas em interação aditiva, sinérgica, antagônica ou indiferente (OFOKANSI et al., 2013; van VUURE; NKWANYANA; WET, 2015; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016), sendo

o efeito sinérgico o que promove interação entre substâncias de forma a elevar um ou mais mecanismos de ação.

Devido às altas CIM eficazes contra microrganismos comparadas aos antimicrobianos, em algumas situações, as fitomoléculas não podem ser utilizadas em monoterapia; por esse motivo, os efeitos das combinações entre antimicrobianos e fitomoléculas têm sido estudados. A terapia combinada entre antimicrobianos é uma das alternativas indicadas para o tratamento de pacientes com IRAS, visto o alto potencial do mecanismo de ação (HAIDAR et al., 2017; KARLOWSKY et al., 2017; ZHU et al., 2018); porém, apesar de bastante promissora, um antimicrobiano pode interferir ou anular o mecanismo de ação do outro antimicrobiano (BREMNER et al., 2016; FAM et al., 2017), bem como exibir um potencial de toxicidade, incluindo a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (ROBERTS et al., 2015; BALOCH et al., 2017; ELJAALY; ALSHEHRI; ERSTAD, 2018; RUTTER; BURGESS, 2018).

Em um amplo estudo realizado na década de 1990 na Argentina, foram testadas 132 espécies vegetais utilizadas empiricamente para fins terapêuticos contra cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina G, *E. coli* e *Aspergillus niger*, sendo verificado que extratos da casca, partes aéreas, folhas, flores, pericarpo de frutos e bulbos produzem fitomoléculas ativas em comparação aos antimicrobianos-padrão: cefazolina, ampicilina e miconazol (ANESINI; PEREZ, 1993).

O estudo de Khan e colaboradores (2006) observou que um alcaloide vegetal presente em *Piper nigrum* e *Piper longum*, a piperina, em combinação à ciprofloxacina² reduziu grandemente as CIM e a concentração de mutação de ciprofloxacina para diversas cepas de *S. aureus*, incluindo MRSA, aparentemente por inibição da bomba de efluxo (KHAN et al., 2006).

Zago e colaboradores (2009) determinaram as possíveis interações entre óleos essenciais (OE) de espécies vegetais associados à diversos antimicrobianos contra *S. aureus* e *E. coli*. Foi verificado um total de 54% de interações sinérgicas das 48 combinações possíveis, dentre os quais, o OE de *Cymbopogon citratus* apresentou efeito sinérgico com todos os antimicrobianos avaliados contra *S. aureus*, seguido por *Mentha piperita* e *Zingiber officinale* Roscoe *Zingiberaceae*; contudo, o OE de *Cinnamomum zeylanicum* não exibiu quaisquer interações. Entre os antimicrobianos

² Ciprofloxacina é uma fluoroquinolona que bloqueia a síntese de DNA (LEBEL, M. Pharmacotherapy; 8(1), 3–33). 1998.

testados, gentamicina exibiu sinergismo com a maioria dos OE, enquanto cefepime apresentou apenas um caso de sinergismo.

No estudo de Salem e colaboradores, o OE de *Eucalyptus globulus* em combinação à ampicilina apresentou interação sinérgica contra *S. aureus* com fenótipo MRSA, reduzindo a CIM do antimicrobiano, e interação aditiva contra *K. pneumoniae* e *C. albicans*. Por outro lado, quando o OE foi associado à anfotericina B revelou interação aditiva, visto que a CIM da combinação foi 32 vezes menor do que o OE; ademais, estas combinações aumentaram a viabilidade celular em células Vero (SALEM et al., 2018).

Assim, estes dados implicam em estudos para verificar a interação sinérgica de produtos naturais com atividade antimicrobiana em combinação aos antimicrobianos disponíveis, uma vez que podem se tornar uma nova alternativa terapêutica promissora ao combate de microrganismos patogênicos.

2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os fatores de virulência são elementos estruturais celulares, produtos ou estratégias, envolvidos nas etapas do processo de infecção (agregação, invasão, sobrevivência e dano) (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2007), os quais auxiliam o patógeno na invasão e na resistência o sistema de defesa do hospedeiro e incluem: cápsula, enzimas e toxinas (GUO; DI PIETRO, 2010). Alguns estão relacionados com a colonização do microrganismo e outros com as lesões do organismo, como por exemplo as toxinas.

2.4.1 Biofilme

Primeiramente, o biofilme foi observado por Antonie van Leeuwenhoek na década de 1675, seguido pelo detalhamento da adesão celular para formação de biofilme por Zobell no ano de 1943 e posterior confirmação do biofilme microbiano através da microscopia por Costerton em 1978 (ZOBELL; ALLEN, 1935; ZOBELL, 1943; COSTERTON et al., 1987; COSTERTON, 1999), sendo estimado que entre 40-80% dos microrganismos vivem sob forma de biofilme (FLEMMING; WUERTZ, 2019).

Estudos têm demonstrado a existência de biofilme em infecções envolvidas em IRAS, como cárie dental, periodontite, otite média, fibrose cística, infecção de ferida crônica, osteomielite, ITU, PAV, etc. (RYBTKE et al., 2015; CHAN et al., 2016; JOHNSTON et al., 2021; LIN et al., 2021; MINKIEWICZ-ZOCHNIAK et al., 2021; NIEDZIELSKI; CHMIELIK; STANKIEWICZ, 2021; VERSEY et al., 2021) ou associadas aos equipamentos e dispositivos, como lentes de contato, válvulas cardiovasculares, implantes, próteses ortodônticas, cateteres vasculares urinários e centrais (HØIBY et al., 2015; WU; CHENG; CHENG, 2019; VERSEY et al., 2021).

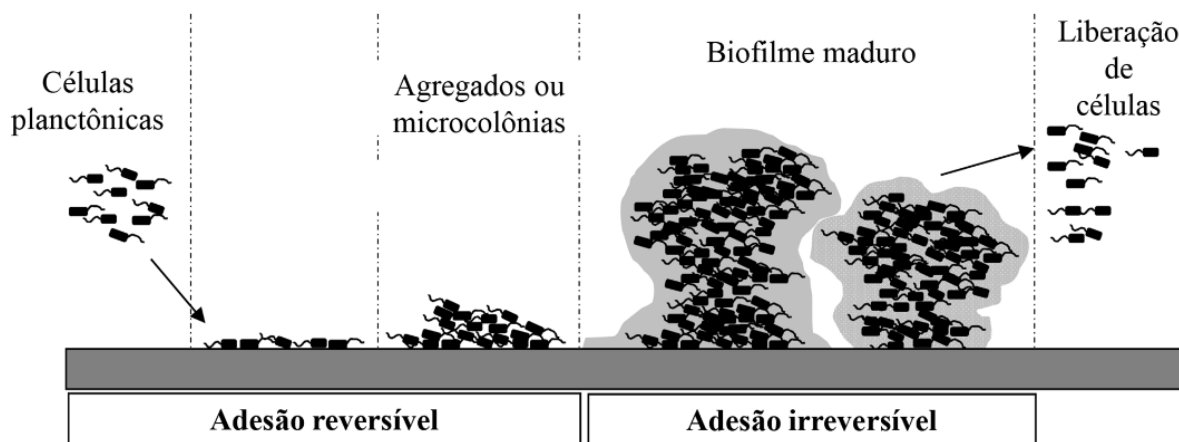
Entre as infecções microbianas e crônicas, aproximadamente, 65% e 80% estão associadas ao biofilme, respectivamente (NIH, 2002; TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013; ALVARADO-GOMEZ et al., 2018; BATISTA et al., 2018; JAMAL et al., 2018; KATIYAR et al., 2018).

Biofilme pode ser descrito como sistema estruturalmente complexo e dinâmico, constituído por até 95% de água, entre 2 e 5% de células microbianas e entre 3 e 6% de matriz extracelular, o que corresponde entre 50 e 90% da massa total do biofilme (SUTHERLAND, 2001; MACEDO; ABRAHAM, 2009; MARTÍNEZ; VADYVALOO, 2014). É compreendido por uma ou mais espécies aderidas à superfície biótica ou abióticas, circundado por matriz polimérica extracelular e composta, principalmente, por polissacarídeos, material genético, proteínas e células mortas (BRANDA et al. 2005), além de canais de influxo e efluxo de nutrientes e de produtos de metabolismo (BJARNSHOLT, 2013).

Entre os fatores microbianos, o biofilme é uma das estratégias utilizadas para promover sua sobrevivência em condições hostis, como na presença de antimicrobianos e fagócitos (MACEDO; ABRAHAM, 2009; OTTO, 2013; ERIKSSON et al., 2017); contudo, essa estrutura oferece inúmeras vantagens para a comunidade, como cooperação metabólica, resistência passiva e transferência horizontal de genes (WOLCOTT et al., 2016; FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017).

Para a formação do biofilme devem ser realizadas algumas etapas (FIGURA 8), como: adesão de células planctônicas à superfície; secreção de adesinas, matriz polimérica extracelular e proliferação celular; formação de microcolônias e maturação do biofilme; e desprendimento celular, retornando à fase planctônica (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013; LIU; ZHANG; JI, 2020).

Figura 8 - Ciclo do biofilme demonstrando as principais etapas para sua formação.



Fonte: Adaptada de Trentin; Giordani; Macedo, 2013.

Entre as principais espécies bacterianas envolvidas em IRAS e associadas à formação de biofilme, há: *A. baumannii*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis*, *Streptococcus viridans*, *K. pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (DONLAN, 2001; OLIVEIRA; PAULA, 2012; ROMLING; BALSALOBRE, 2012; GOULART, et. al., 2015; LIU; ZHANG; JI, 2020; SHENKUTIE et al., 2020; MEA; YONG; WONG, 2021; TAHAEI et al., 2021). A maioria desses patógenos, como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* possuem fatores preestabelecidos responsáveis, também, em provocar patologias, incluindo os padrões moleculares ou toxinas; contudo, para *A. baumannii* foi atribuída a associação entre mecanismos de ação e fatores de virulência, como biofilme, *pili*, cápsula polissacarídica, entre outros (MEA; YONG; WONG, 2021).

A formação de biofilme por *A. baumannii* auxilia sua colonização em equipamentos hospitalares e dispositivos invasivos em pacientes, além de promover sua sobrevivência em condições desfavoráveis de crescimento (BIGOT; SALCEDO, 2017). Para tal, devido à pouca ou nenhuma disponibilidade de antimicrobianos para erradicar as IRAS envolvendo o biofilme, se torna necessário o desenvolvimento de alternativas terapêuticas eficazes e seguras (CIOFU et al., 2015; RYBTKE et al., 2015). O estudo de Di Domenico e colaboradores (2017) revelou que 94.6% dos isolados de *S. aureus* com fenótipo MRSA foram moderados a altamente formadores de biofilme. Por outro lado, entre os isolados de *A. baumannii* MDR, apenas 58.3%

produziram biofilme; contudo, é relevante a atenção à *A. baumannii* MDR, enfatizando sua virulência e patogênese (MEA; YONG, WONG, 2021).

No ano de 2020, Oliveira Júnior e colaboradores analisaram isolados clínicos MDR de *S. aureus* de *A. baumannii*, sendo classificados como moderados formadores de biofilme e fortes formadores de biofilme, respectivamente, através da análise das densidades óticas dos isolados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a citotoxicidade da riparina III associada a antimicrobianos e avaliar sua atividade antimicrobiana, inibitória e erradicatória do biofilme e as possíveis alterações ultraestruturais em isolados clínicos multidroga-resistentes de *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artigo 1

- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima da riparina III e antimicrobianos (ciprofloxacina, oxacilina, meropenem e colistina) em isolados MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*;
- ✓ Analisar o efeito sinérgico da riparina III associada a cada antimicrobiano (ciprofloxacina, oxacilina, meropenem e colistina) em isolados MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*;
- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima reversa da riparina III associada ao antimicrobiano com concentração sinérgica;
- ✓ Determinar o tempo de morte de isolados MDR submetido à riparina III associada ao antimicrobiano com concentração subinibitória;
- ✓ Verificar as alterações ultraestruturais induzidas em isolados MDR da riparina III associada ao antimicrobiano com concentração subinibitória;

Artigo 2

- ✓ Investigar a ação hemolítica *in vitro* da riparina III associada à colistina;
- ✓ Averiguar a formação de biofilme de isolados MDR de *A. baumannii*;
- ✓ Avaliar a inibição e erradicação do biofilme de isolados MDR de *A. baumannii* pela combinação subinibitória entre riparina III e colistina;
- ✓ Averiguar as alterações ultraestruturais em isolados MDR de *A. baumannii* pela combinação entre riparina III e colistina;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA RIPARINA III

A riparina III foi obtida do fruto verde e cálice da *Aniba riparia* (Nees) Mez., pertencente à família Lauraceae. Este composto compõe a classe das alcanidas, os quais foram extraídos, purificados e sintetizados de acordo com a metodologia estabelecida no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica na Universidade Federal da Paraíba (BARBOSA-FILHO et al., 1987). O composto foi gentilmente cedido e armazenado em recipiente apropriado, sem contato direto com a luz à 23°C.

4.2 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos convencionais utilizados para testes da atividade antimicrobiana e em combinação à riparina III foram: oxacilina, ciprofloxacina, meropenem e colistina (Sigma-Aldrich, USA). Soluções de antimicrobianos foram preparadas de acordo com o CLSI (2019) e foram estocados em temperatura especificadas pelo fabricante.

4.3 CEPAS PADRÃO ATCC E ISOLADOS BACTERIANOS MULTIDROGA-RESISTENTES

Foram utilizadas cepas bacterianas padronizadas para testes de resistência aos antimicrobianos pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019): *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *K. pneumoniae* (K483), padronizada no laboratório para ensaios de biofilme. Os isolados bacterianos multidroga-resistentes (MDR) foram obtidos em dois hospitais públicos do Recife/PE por demanda espontânea e vigilância entre 2013 e 2014 e estão estocados em glicerol a 20% em freezer com temperatura de -80°C, pertencendo à bacterioteca do Laboratório de Biologia Celular e Molecular no Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ/PE (TABELA 2).

Tabela 2 - Caracterização e perfil de resistência aos antimicrobianos de isolados multidroga-resistentes de *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* obtidos de hospitais públicos do Recife/PE.

ESPÉCIES	ISOLADOS	RESISTÊNCIA
<i>A. baumannii</i>	54	AMI, AMP, CAZ, CIP, CST, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM
<i>A. baumannii</i>	808	ACR, AMP, CAZ, CIP, CPM, CRO, CRX, GEN, IPM, MPM
<i>S. aureus</i>	170	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	382	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN

Legenda: ACR, Axetilcefuroxima; AMI, Amicacina; AMP, Ampicilina; CAZ, Ceftazidima; CIP, Ciprofloxacina; CLI, Clindamicina; CST, Colistina; CPM, Cefepime; CRO, Ceftriaxona; CRX, Cefuroxima; CRX/A, Cefuroxima/Axetil; ERI, Eritromicina; GEN, Gentamicina; IPM, Imipenem; MOX, Moxifloxacina; MPM, Meropenem; NOR, Norfloxacin; OXA, Oxacilina; PEN, Benzilpenicilina.

A identificação das espécies bacterianas e o perfil de resistência aos antimicrobianos foram determinados pelo sistema automatizado VITEK-2 (*Biomérieux*), fornecidos pelos hospitais-fonte e confirmados no laboratório. Para o estudo, foram selecionados dois isolados bacterianos MDR de cada espécie (*S. aureus* e *A. baumannii*), os quais são carreadores de genes de resistência, virulência e não possuem relação clonal.

Todos os isolados bacterianos foram reativados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) para enriquecimento microbiano por 24h em estufa bacteriológica a 35°C±1 e posteriormente semeados em ágar BHI, incubados para cultivo e isolamento bacteriano.

4.4 AÇÃO HEMOLÍTICA DA RIPARINA III E ANTIMICROBIANOS

A ação hemolítica da riparina III e colistina foi realizada através da técnica sobre hemácias do tipo O+, descrita por Becerra et al. (2012). As combinações entre a riparina III e cada antimicrobiano foram testadas por microdiluição seriada com solução salina (NaCl 0,85% e CaCl₂ 10 nM) em microplacas de 96 poços nas concentrações sinérgicas (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2023). Logo, 2 mL de sangue total foram dissolvidos em solução 18 mL de salina (NaCl 0,85% e CaCl₂ 10 nM) e centrifugados a 2500 rpm por 2 min, com sobrenadante desprezado.

Foi adicionado como controle positivo de lise celular o Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) a 1% e um controle negativo (células em solução salina). Após incubação por 3 h a 36°C±1 sob agitação constante, as microplacas

foram centrifugadas a 3.500 rpm por 4 min a 24°C, para separação entre o sobrenadante e o *pellet*.

Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Benchmark plus, Bio-Rad®, Califórnia, EUA) a 540 nm para estimar o percentual de hemólise. Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata e os resultados foram expressos como porcentagem de hemólise determinada através da equação:

$$\text{Ação hemolítica (\%)} = \frac{(\text{Abs. do tratado} - \text{Abs. do controle negativo}) \times 100}{(\text{Abs. do controle positivo} - \text{Abs. do controle negativo})}$$

4.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA RIPARINA III E ANTIMICROBIANOS

A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo em triplicata, tendo a cepa *E. coli* (ATCC 25922) como controle de qualidade (CLSI, 2019). Colônias microbianas obtidas de sementeiras recentes foram inoculadas por 4-6 h em 3 mL de caldo BHI a 35°C±1. Nas microplacas de 96 poços foram adicionados 200 µL de caldo Mueller Hinton Ca⁺² ajustado, a riparina III diluída em DMSO a 1% nas concentrações de 400 µg/mL a 3,125 µg/mL (CATÃO et al., 2010; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2020) e cada antimicrobiano isoladamente (oxacilina, ciprofloxacina, colistina e meropenem) diluído em água Milli-Q estéril, de acordo com o padrão descrito pelo CLSI (2019) para que atinja a concentração ideal.

Seguida à microdiluição, foi adicionado 1 µL do inóculo ajustado em 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As microplacas foram incubadas a 35°C±1 por 18-24 h em estufa bacteriológica. Cada experimento foi realizado contendo um controle negativo do experimento (meio de cultura e a combinação entre riparina III e cada antimicrobiano) e um controle positivo (meio de cultura e cada isolado testado). A leitura foi realizada por observação da turbidez, sendo as últimas concentrações que não exibirem crescimento visível foram consideradas a CIM. Os critérios de resistência aos antimicrobianos foi baseado nos padrões estabelecidos pelo CLSI (2019). Para a confirmação da CIM, foi efetuado a avaliação colorimétrica com resazurina (0,01%) por 2-4 h em temperatura ambiente (PALOMINO et al., 2002).

4.6 MÉTODO CHECKERBOARD

A associação da riparina III com cada antimicrobiano citado anteriormente foi analisada por microdiluição seriada a partir de 2X CIM de cada antimicrobiano e da riparina III. Este teste foi realizado em microplaca de 96 poços em caldo Mueller Hinton Ca^{+2} ajustado, seguida por microdiluição seriada (WENTAO et al., 2018). Após, foram distribuídos 30 μL de inóculo ajustado a $1,5 \times 10^5$ UFC/mL, seguida por incubação por 24 h a 36 ± 1 °C.

A leitura visual do crescimento microbiano foi baseada em Pillai e colaboradores (2005) e Leite e colaboradores (2015), sendo estes dados confirmados por avaliação colorimétrica com resazurina (0,01%) por 2-4 h em temperatura ambiente (PALOMINO et al., 2002). A interação entre as diferentes concentrações foi calculada pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionada (*Fractional Inhibitory Concentration Index* - FICI):

$$\text{FICI} = \frac{(\text{CIM RipIII na associação})}{(\text{CIM RipIII})} + \frac{(\text{CIM antimicrobiano na associação})}{(\text{CIM antimicrobiano})}$$

O FICI obtido foi classificado em: sinérgico ($\text{FICI} \leq 0,5$), aditivo ($0,5 < \text{FICI} \leq 1$), indiferente ($1 < \text{FICI} \leq 4$) e antagônico ($\text{FICI} > 4$ ICIF), de acordo com Pillai e colaboradores (2005).

4.7 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA REVERSA

Para determinar a habilidade da riparina III em potencializar o efeito de cada antimicrobiano, os isolados clínicos foram submetidos à combinação sinérgica determinada pelo método de *Checkerboard* com caldo Mueller Hinton Ca^{+2} ajustado por 18 h à 36 ± 1 °C. A habilidade da riparina III em reverter a CIM de antimicrobianos foi determinada pela redução da CIM e representada pelo Fator Modulador (Modulation Factor - MF), calculado por: $\text{CIM}_{\text{droga}}/\text{CIM}_{\text{droga}}$ em combinação (KAUR et al., 2018).

4.8 TEMPO DE MORTE

Para a determinação do tempo de morte, os isolados MDR das espécies que exibiram concentração sinérgica determinada pelo método de *Checkerboard* foram submetidos à concentração subinibitória ($1 \times \text{CIM}$) da associação da riparina III e colistina, as suspensões bacterianas foram ajustadas a 0.5 da escala de McFarland ($1.5 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$) com caldo Mueller Hinton Ca^{+2} ajustado. As alíquotas foram removidas de cada solução-teste para determinar a quantificação de colônias a 0, 3, 6, 12 e 24 h de incubação (WENTAO et al., 2018), utilizando densidade inicial de células de $1 \text{ a } 5 \times 10^5$, de acordo com a CIM apresentada por cada isolado microbiano.

A cada hora, $1 \mu\text{L}$ da alíquota da amostra foi removida e diluído (1:1000) com salina (0.9% NaCl) e semeado em ágar Mueller Hinton, seguido por incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h para determinar a contagem de colônias bacterianas. Todos os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata e os resultados construídos pela contagem média das colônias ($\log_{10} \text{ UFC/mL}$) vs. tempo (TANG et al., 2017).

4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os isolados MDR das espécies bacterianas que exibiram concentração sinérgica determinada pelo método de *Checkerboard* (item 4.6) foram submetidos à concentração subinibitória da associação da riparina III e colistina por 8 h, com inclusão da cepa padrão (ATCC 25922 *E. coli*) nas mesmas condições. As células foram lavadas em tampão fosfato 0.1M (pH 7.4), centrifugadas e fixadas em Karnovisk (glutaraldeído a 2.5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M) durante 60 min.

Todos os isolados foram lavados em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1 M por 90 min. Em seguida, foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1 M para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 100% por 10 min cada etapa. Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por CO_2 , obtendo-se a secagem do material para montagem do material seco em *stubs* metálicos utilizando uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foi realizada a metalização, cobrindo o material por uma fina camada de ouro,

para visualização em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV (OLIVEIRA JÚNIOR et al. 2020).

4.10 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Somente os isolados MDR com concentração sinérgica foram submetidos à concentração subinibitória da associação da riparina III e colistina por 8 h, com inclusão da cepa padrão (ATCC 25922 *E. coli*) nas mesmas condições.

As células microbianas foram lavadas em tampão fosfato 0.1 M (pH 7.4) por três vezes e centrifugadas para fixação em Karnovisk (glutaraldeído a 2.5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M) por 60 min. Após as três lavagens em tampão fosfato por 10 min, foi realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 1,5 h. As três lavagens em tampão fosfato de sódio 0,1 M e água destilada por duas vezes de 10 min foi realizada a desidratação com uma série crescente de acetona de 30-100%. Finalizando, foi realizada a infiltração do material e emblocamento em resina Epon 812 para posteriores cortes ultrafinos. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai™ Spirit G2 BioTWIN (OLIVEIRA JÚNIOR et al. 2020).

4.11 FORMAÇÃO DE BIOFILME

A quantificação de biofilme foi observada pela técnica descrita por Stepanović et al. (2000), com adaptações. Todos os isolados bacterianos MDR com concentração sinérgica foram submetidos à concentração subinibitória da associação da riparina III e colistina por 8 h, com inclusão da cepa padrão (ATCC 25922 *E. coli*) nas mesmas condições. Em microplacas (96 poços) foram adicionados 200 µL das suspensões bacterianas (1.5×10^8 UFC/mL) e incubadas por 24 h a 37 ± 1 °C. Como controle positivo, foi utilizada a cepa *K. pneumoniae* (K483), padronizada no laboratório para ensaios de biofilme.

Suspensões bacterianas foram removidas, seguida por lavagens com 200 µL de solução salina estéril e depósito das microplacas em temperatura (55-60 °C) para secagem por 40-60 min. Após este período, foi adicionado o cristal violeta por 15 min,

seguida por lavagens por imersão em água. Nas microplacas secas foram adicionados 200 µL de etanol (P.A.) por 30 min para fixação. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância em 570 nm (Benchmark plus, Bio-Rad®, Califórnia, EUA).

As amostras foram descritas, baseadas nos critérios de Stepanović e colaboradores (2000). O valor das densidades ópticas (DO_i) de cada isolado foi obtido por média dos poços, sendo este valor comparado à densidade óptica do controle negativo (DO_c). Os isolados foram classificados em quatro categorias, de acordo com a média das DO_i relacionadas aos resultados obtidos para a DO_c : não aderente ($DO_i \leq DO_c$), fracamente aderente ($DO_c < DO_i \leq 2 \times DO_c$), moderadamente aderente ($2 \times DO_c < DO_i \leq 4 \times DO_c$), ou fortemente aderente ($4 \times DO_c < DO_i$).

4.12 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME

Os isolados MDR que foram inibidos em concentração sinérgica entre riparina III e antimicrobiano foram submetidos à concentração subinibitória por 8 h, com adição da cepa padrão (ATCC 25922 *E. coli*) nas mesmas condições. A atividade de inibição do biofilme foi adaptada das metodologias de Stepanović e colaboradores (2000) e Anbazhagan e colaboradores (2012). Em microplaca de 96 poços foram adicionados 200 µL da solução contendo a riparina III associada ao antimicrobiano avaliado na concentração subinibitória, a suspensão microbiana (10^8 UFC/mL) e 0.7 cm de cateter estéril (POUR et al., 2011).

Como controle positivo foi utilizada uma cepa bacteriana conhecidamente formadora de biofilme *K. pneumoniae* (K483), padronizada no laboratório para ensaios de biofilme. Após a incubação por 24 h a 36 ± 1 °C, o cateter foi cuidadosamente removido, lavado em água destilada estéril e fixado em tampão fosfato (0.1 M) para microscopia eletrônica.

As suspensões bacterianas (1.5×10^8 UFC/mL) foram lavadas com solução salina (0,85 %) estéril e secadas à 60 ± 1 °C por 40-60 min. Em seguida, foi adicionado o cristal violeta por 15 min e posterior lavagem por imersão. Logo após a lavagem na microplaca, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto por 30 min e análise por espectrofotometria a 570 nm (Benchmark plus, Bio-Rad®, Califórnia, EUA). A média dos valores das DO_i de cada isolado foi classificada de acordo com Stepanović e colaboradores (2000).

4.13 ERRADICAÇÃO DO BIOFILME

Apenas os isolados MDR que foram inibidos na concentração sinérgica foram submetidos à concentração subinibitória da associação da riparina III e colistina por 8 h, com inclusão da cepa padrão (ATCC 25922 *E. coli*) nas mesmas condições. A erradicação do biofilme foi verificada de acordo com Stepanović e colaboradores (2000) e Arshia e colaboradores (2017), com adaptações. Em microplaca de 96 poços foi adicionado um total de 200 μ L da suspensão microbiana (1.5×10^8 UFC/mL) e 0.7 cm de cateter estéril (POUR et al., 2011), seguida por incubação por 24 h a 36 ± 1 °C. Como controle positivo foi utilizada uma cepa bacteriana conhecida formadora de biofilme *K. pneumoniae* (K483), padronizada no laboratório para ensaios de biofilme. Em seguida foi realizada a leitura por espectrofotometria a 570 nm (*Benchmark plus*, *Bio-Rad*®, Califórnia, EUA) e posterior classificação de cada isolados de acordo com Stepanović e colaboradores (2000).

Logo após, as suspensões foram removidas da microplaca, seguida pela adição de 200 μ L da solução contendo riparina III associada ao antimicrobiano avaliado na concentração subinibitória, e novamente incubada por 24 h à 36 ± 1 °C. Após este período, o cateter foi removido, lavado em água destilada estéril e fixado em tampão fosfato 0.1 M para análise em microscopia eletrônica. O volume será removido e a microplaca será lavada com solução salina (0,85%) estéril e secada em $60^\circ\text{C} \pm 1$ por 40-60 min. foi adicionado o cristal violeta por 15 min, seguida por lavagens por imersão em água. Na microplaca foi adicionado um volume de 200 μ L de etanol absoluto por 30 min, seguida por leitura em espectrofotometria a 570 nm (*Benchmark plus*, *Bio-Rad*®, Califórnia, EUA) e classificação de cada isolado segundo a densidade óptica (STEPANOVIĆ et al., 2000).

4.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO BIOFILME

Os isolados MDR das espécies bacterianas sensíveis às concentrações sinérgicas determinadas pelo método de *Checkerboard* (item 4.6) foram submetidos à concentração subinibitória da associação da riparina III e colistina por 8 h, com inclusão da cepa padrão (ATCC 25922 *E. coli*) nas mesmas condições. As células

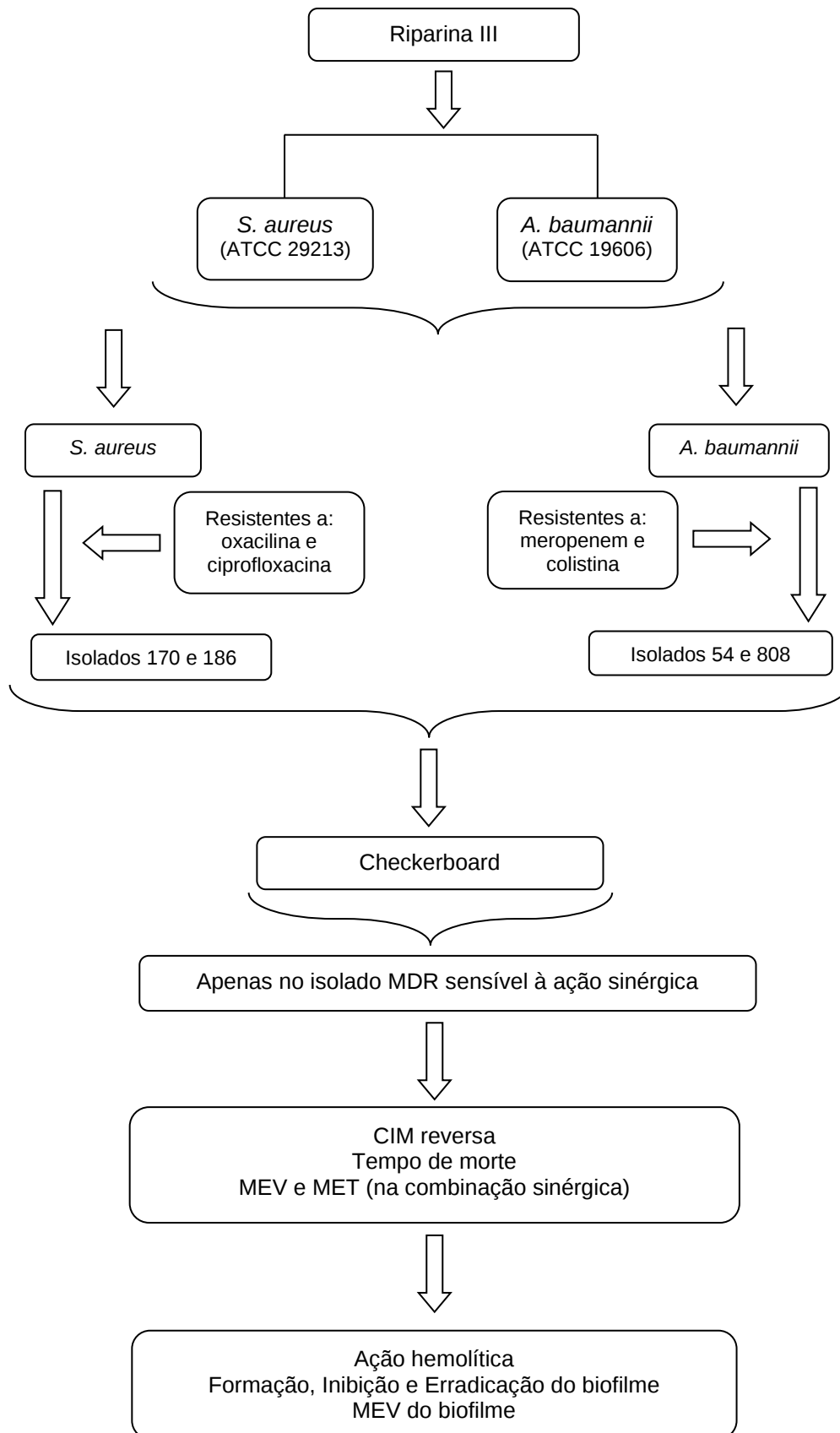
foram lavadas em tampão fosfato 0.1M (pH 7.4), centrifugadas e fixadas em Karnovisk (glutaraldeído a 2.5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M) durante 60 min.

Todos os isolados foram lavados em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1 M por 90 min. Em seguida, foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1 M para posterior desidratação, utilizando uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 100% por 10 min cada etapa. Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por CO₂, obtendo-se a secagem do material para montagem do material seco em *stubs* metálicos utilizando uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foi realizada a metalização, cobrindo o material por uma fina camada de ouro, para visualização em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV (OLIVEIRA JÚNIOR et al. 2020).

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O percentual hemolítico e tempo de morte (*time-kill*) foram determinados por regressão linear utilizando o programa SPSS 18.0 (IBM Co., New York, USA) para Windows. A análise de significância da formação, inibição e erradicação do biofilme, considerando valores significativos $p < 0.05$, foram descritos por teste ANOVA usando o programa *GraphPad Prism* 5.0 (*Graphpad*, California, USA) para Windows.

4.16 FLUXOGRAMA



5 RESULTADOS

Artigo 1: Atividade *in vitro* da riparina III em combinação com antimicrobianos contra isolados clínicos multidroga-resistentes de *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii*. **Fator de Impacto:** 6.656. **Qualis:** A1.

Phytomedicine Plus 3 (2023) 100414



Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine Plus

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/phytomedicine-plus



In vitro activity of riparin III in combination with antimicrobials against multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*

Jorge Belém Oliveira-Júnior^{a,*}, Fernanda Cristina Gomes de Lima^b, Elza Ferreira Firmo^b, Daivyane Aline Mota da Rocha^a, Jana Messias Sandes^c, Stanley Juan Chavez Gutierrez^d, Celso Amorim Camara^e, José Maria Barbosa-Filho^f, Luiz Carlos Alves^{a,c}, Fábio André Brayner^{a,c}

^a Laboratory of Molecular and Cellular Biology, and Laboratory of Leishmaniasis and Mutagenesis, Department of Parasitology, Aggeu Magalhães Institute (FIOCRUZ/PE), Recife, PE, Brazil

^b Central Laboratory of Public Health of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^c Keizo Asami Institute, Federal Universidad of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^d Pharmacy Course Coordination, Federal Universidad of Piauí, Teresina, PI, Brazil

^e Department of Chemistry, Rural Federal Universidad of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^f Laboratory of Pharmaceutics Technology, Federal Universidad of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

RESUMO

S. aureus e *A. baumannii* estão entre as principais espécies bacterianas responsáveis por diversas infecções em todo o mundo, devido aos diferentes mecanismos de resistência e virulência, que podem interferir no tratamento. O uso de combinação antimicrobiana é uma das opções terapêuticas; entretanto, podem apresentar potencial para nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Portanto, o uso da combinação de compostos naturais e antimicrobianos tem sido estudado, considerando a eficácia da atividade antimicrobiana e redução dos efeitos tóxicos. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito sinérgico entre riparina III e antimicrobianos contra *S. aureus* e *A. baumannii*, bem como possíveis alterações ultraestruturais induzidas pela combinação sinérgica. Riparina III e antimicrobiano (ciprofloxacina, oxacilina, meropenem e colistina) contra isolados clínicos multidroga-resistentes (MDR) e a determinação da CIM (concentração inibitória mínima) foi realizada através da microdiluição em caldo. O método do *Checkerboard* e o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) foram utilizados para determinar o tipo de interação entre os diferentes antimicrobianos e riparina III, e os ensaios de tempo de morte confirmaram os resultados. Por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Transmissão (MET) foram observadas possíveis alterações morfológicas em células bacterianas. *S. aureus* exibiu resistência à oxacilina e ciprofloxacina, e *A. baumannii* foram descritos como resistentes ao meropenem e o isolado 54 foi resistente à colistina. O FICI para *A. baumannii* indicou sinergismo entre riparina III e colistina, e a CIM reversa revelou uma redução bastante significativa da CIM da colistina em combinações sinérgicas. O *Checkerboard* e o tempo de morte demonstraram um potencial de sinergia nesta combinação contra *A. baumannii* e apresentou atividade bactericida. Diversas alterações ultraestruturais em *A. baumannii* submetidos à tratados com as concentrações sinérgicas foram visualizados por MEV e MET, como redução no número de células, aparência rugosa, além de morfologias indefinidas e desfragmentação total da parede celular bacteriana. Portanto, a combinação de riparina III e colistina mostrou sinergismo contra *A. baumannii* MDR e diminuição na CIM de colistina, bem como diversas alterações ultraestruturais nas células bacterianas.

Palavras-chave: Riparina III, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Checkerboard*, Tempo de morte, Microscopia eletrônica.

INTRODUÇÃO

Espécies bacterianas, como *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii*, são responsáveis por infecções hospitalares e adquiridas na comunidade em todo o mundo (Bhatta et al., 2019; Chen et al., 2019; Dabaja-Younis et al., 2021; El Mekes et al., 2019; Kim et al., 2020; van Duin e Paterson, 2016; Wongsurakiat e Chitwarakorn, 2019). Essas espécies são duas das seis 'superbactérias' identificadas pela Sociedade de Doenças Infecciosas da América como o grupo "ESKAPEE" (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) e foram recentemente designados como categoria 2 (alta) e 1 (crítica), respectivamente, patógeno prioritário resistente a antibióticos pela Organização Mundial da Saúde (de Oliveira et al., 2020; OMS, 2017).

As opções atuais de tratamento para infecções causadas por *S. aureus* e *A. baumannii* são limitadas. Como não existe um antimicrobiano universalmente eficaz para todas as infecções, uma das estratégias é o uso combinado de antimicrobianos (Wright, 2017). Assim, vários estudos relatam a eficiência da terapia antimicrobiana combinada para o tratamento de infecções envolvendo espécies bacterianas multidroga-resistentes (MDR) (Coronado-Alvarez et al., 2019; Firmo et al., 2020; Park et al., 2016; Wang et al., 2019; Zhu et al., 2018). No entanto, o antagonismo não é incomum em combinações antimicrobianas (Moellering, 1983) e muitas vezes há possibilidades do surgimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos como aumento da pressão seletiva (Tyers e Wright, 2019).

Além disso, alguns antimicrobianos apresentam alto potencial de toxicidade, incluindo nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Baloch et al., 2017; Eljaaly et al., 2018; Roberts et al., 2015; Rutter e Burgess, 2018). Esses fatores indicam que o uso de produtos naturais como fontes de novos antimicrobianos e redução de efeitos tóxicos é essencial (Bush et al., 2014; Song et al., 2021; Wright, 2017).

Os produtos naturais e seus derivados têm sido reconhecidos como fonte no desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos, devido a diversas atividades biológicas (Araújo et al., 2016; Correa et al., 2019; Malafaia et al., 2018; Marchese et al., 2018; Oliveira Júnior et al., 2020; Wright, 2017). Além disso, sabe-se que os produtos naturais têm sido utilizados como alternativa terapêutica *in vitro* promissora

para microrganismos envolvidos em Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (Aleksic et al., 2014; Subramani et al., 2017). Riparina III ($C_{16}H_{17}NO_4$) é uma alcalamida natural obtida da *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Fig. 1), e é conhecida por exibir várias atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* (Barbosa et al., 1988; Barbosa-Filho et al., 1987; Catão et al., 2005, 2010; Marques, 2001; Oliveira Júnior et al., 2020). Além disso, este composto natural apresenta inibição de biofilme em MDR *S. aureus*, baixa toxicidade e promove alterações ultraestruturais em isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii* (Oliveira Júnior et al., 2020).

Diversos estudos descrevem a atividade sinérgica de produtos naturais combinados com antimicrobianos contra espécies bacterianas de importância médica (Aleksic et al., 2014; Lee et al., 2017; Silva et al., 2019; Sulieman et al., 2017; Torres et al., 2016). Sanhueza e cols. (2017) avaliaram a sinergia entre extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*), que é o principal resíduo orgânico gerado nas indústrias de vinho, com antibióticos, incluindo oxacilina e ciprofloxacina, contra MDR *S. aureus* e *E. coli*. Essas combinações reduziram significativamente as CIMs de oxacilina e ciprofloxacina contra *S. aureus*, o que pode reduzir os efeitos colaterais e os custos do tratamento.

Bardbari et al. (2018) observaram que tanto a melitina (um peptídeo de veneno de abelha com 26 resíduos) em combinação com combinações de colistina ou imipenem exibem atividade antimicrobiana sinérgica contra MDR *A. baumannii*; além disso, a combinação sinérgica de melitina/colistina inibiu completamente a produção de biofilme desta espécie bacteriana. Outro composto natural, o pterostilbeno (3',5'-dimetoxi-4-hidroxiestilbeno), um análogo do resveratrol isolado principalmente de mirtilos e uvas, foi observado que aumenta a atividade da polimixina B *in vitro* e *in vivo* e tem um efeito sinérgico com a colistina (Zhou et al., 2018).

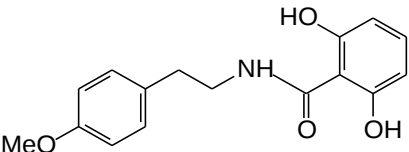
Este estudo teve como objetivo analisar o efeito antimicrobiano da riparina III em combinação com antimicrobianos contra isolados clínicos multidroga-resistentes de *S. aureus* e *A. baumannii*, bem como possíveis alterações ultraestruturais induzidas pela combinação sinérgica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção da riparina III

A riparina III é uma alcalamida natural isolada do fruto verde ou cálice de *A. riparia* (Ness) Mez., família Lauraceae (FIGURA 1). Este composto foi quimicamente sintetizado através da reação de Schotten-Baumann no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (Barbosa-Filho et al. 1987; Branco et al., 2000) e foi gentilmente cedido. A riparina III é um composto quimicamente conhecido como: *(O-metil)-N-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina* ou *N-[8'-(4'-Metoxifenilet)]-2,6-dihidroxi-benzoilamida* (Barbosa-Filho et al., 1987).

Figura 1 - Descrição das características químicas e moleculares da riparina III.

Nome	Classe Química	Fórmula Química	Peso Molecular	Solubilidade	Fórmula Estrutural
Riparina III	Benzoil-Tiramina	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	287	Cremophor, DMSO, Tween 80	

Barbosa-Filho et al. 1987.

Agentes antimicrobianos

Os antimicrobianos convencionais utilizados para testes em combinação com riparina III foram: oxacilina, ciprofloxacina, meropenem e colistina (Sigma-Aldrich, EUA). As soluções de antimicrobianos foram preparadas de acordo com CLSI (2019) e armazenadas a -20°C.

Isolados clínicos multidroga-resistentes

A riparina III e cada antimicrobiano foram testados contra isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*. Os isolados clínicos foram obtidos de dois hospitais públicos de Recife/Pernambuco/Brasil por demanda espontânea e vigilância entre os anos de 2013 e 2014 (TABELA 1). A identificação bacteriana e a determinação do

perfil de resistência antimicrobiana foram obtidas pelo sistema automatizado VITEK-2 (*Biomérieux*), fornecidos pelos hospitais de origem, seguida por confirmação laboratorial. No estudo, foram selecionados dois isolados bacterianos MDR de cada espécie, sendo portadores de genes de resistência e virulência e sem relação clonal (dados não publicados).

Tabela 1 - Perfil de resistência antimicrobiana de isolados clínicos obtidos em hospitais públicos de Recife/Pernambuco/Brasil.

ESPÉCIE BACTERIANA	ISOLADOS	HOSPITAIS	RESISTÊNCIA
<i>A. baumannii</i>	54	A	AMK, AMP, CAZ, CIP, CPM, CRO, CST, GEN, IPM, MEM
<i>A. baumannii</i>	808	B	ACR, AMP, CAZ, CIP, CPM, CRO, CRX, GEN, IPM, MEM
<i>S. aureus</i>	170	A	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	382	B	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN

Legenda: A, hospital 1; B, hospital 2; ACR, Axetilcefuroxima; AMK, Amicacina; AMP, Ampicilina; CAZ, Ceftazidima; CIP, Ciprofloxacina; CLI, Clindamicina; CPM, Cefepime; CRO, Ceftriaxona; CRX, Cefuroxima; CST, Colistina; ERI, Eritromicina; GEN, Gentamicina; IPM, Imipenem; MOX, Moxifloxacina; MEM, Meropenem; NOR, Norfloxacina; OXA, Oxacilina; PEN, Benzilpenicilina.

A ativação bacteriana foi realizada com 30 µL do estoque (os isolados bacterianos foram armazenados em glicerol a 20%) de cada isolado clínico que foram inoculados em caldo BHI para enriquecimento microbiano. Em seguida, foram incubados por 18-24 h em estufa bacteriológica a 36±1 °C. Após esse período, foram semeadas em ágar BHI ágar e incubadas em estufa a 36±1 °C por 18-24 h para cultivo e isolamento bacteriano. A concentração de células bacterianas (1.5×10^8 UFC/mL), ajustada para corresponder ao padrão de turbidez de 0.5 McFarland de isolados clínicos MDR.

Preparação de soluções padrão

A solução estoque de riparina III foi preparada separadamente em DMSO na concentração de 1 mg/mL e armazenada a 20°C. Os antimicrobianos foram diluídos em água ultrapura e armazenados de acordo com o fabricante.

Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) da riparina III e cada antimicrobiano foram determinados contra isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii* através da microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços contendo caldo Mueller Hinton Ca^{+2} ajustado. A microdiluição da riparina III foi realizada nas concentrações de 400 a 3.125 $\mu\text{g/mL}$ (Oliveira Júnior et al., 2020) e os antimicrobianos testados foram avaliados de acordo com as normas do CLSI (2019). A suspensão bacteriana foi ajustada ao padrão de turbidez de 0.5 McFarland, adicionada e incubada por 18-24 h a 36 ± 1 °C. Cada experimento foi realizado contendo controle negativo (meio de cultura, água ultrapura, riparina III e cada antimicrobiano isoladamente) e controle positivo (meio de cultura com isolado bacteriano testado). Os resultados foram analisados quanto à turbidez, indicando que as últimas concentrações que não exibiram crescimento bacteriano visível foram consideradas a CIM (CLSI, 2019).

Posteriormente, os resultados foram confirmados com teste colorimétrico; assim, 20 μL de resazurina foram adicionados na microplaca para analisar a viabilidade celular bacteriana por colorimetria. Após 2 h, a presença da cor azul representa a ausência de crescimento celular bacteriano e a cor rosa resulta na presença de crescimento bacteriano (Palomino et al. 2002). Os testes foram realizados em triplicata, utilizando como controle de qualidade as cepas de *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 29213) e *A. baumannii* (ATCC 19606) (CLSI, 2019).

Método Checkerboard

A ação da riparina III em combinação com cada antimicrobiano foi analisada em duplicata com caldo Mueller Hinton Ca^{+2} ajustado através do método *Checkerboard* em microplaca de 96 poços (WENTAO et al., 2018). Em seguida, um cálculo de diluição foi realizado para obter uma concentração de $\times 2$ CIM de cada antimicrobiano e riparina III. Cada experimento foi realizado contendo controle negativo (meio de cultura, água ultrapura, riparina III e cada antimicrobiano isoladamente) e controle positivo (meio de cultura com isolado bacteriano testado).

Essa técnica é indicada para determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (*Fractional Inhibitory Concentration Index* - FICI), calculado como: $\text{FICI} =$

CIM da droga A em combinação/CIM da droga A isolada + CIM da droga B em combinação/CIM da droga B isolada. Em *S. aureus* foram testadas as combinações entre riparina III/oxacilina e riparina III/ciprofloxacina, enquanto em *A. baumannii* foram avaliadas as combinações entre riparina III/meropenem e riparina III/colistina. Após, foram adicionados 30 µL de inóculo ajustado em 0.5 McFarland e incubados por 24 h a 36 ± 1 °C. Os resultados foram confirmados com resazurina (PALOMINO et al. 2002). O FICI calculado foi interpretado como sinergia ($FICI \leq 0,5$), indiferente ($0,5 < FICI \leq 4,0$) ou antagonismo ($FICI > 4,0$), conforme Odds (2003).

CIM reversa

Para determinar a capacidade da riparina III de potencializar o efeito de cada antimicrobiano, o fator de modulação (*Modulation Factor* - MF) foi calculado como $CIM_{\text{droga}}/CIM_{\text{droga}}$ em combinação para cada combinação sinérgica (Kaur et al., 2018).

Tempo de morte

A taxa de morte bacteriana foi realizada apenas nas combinações consideradas sinérgicas no método *Checkerboard*. Para tanto, preparou-se uma solução estoque de riparina III (100 µg/ml) e antimicrobianos (100 mg/ml de cada) (Tabela 3). A curva do tempo de morte foi investigada através do método de microdiluição em caldo na concentração de $\times 1$ CIM e as suspensões bacterianas foram ajustadas para 1×10^8 UFC/ml com caldo Mueller Hinton Ca^{+2} ajustado.

As contagens bacterianas foram medidas em 0, 3, 6, 12 e 24 h (WENTAO et al., 2018). A cada hora, uma alíquota de 1 µl de cada amostra foi retirada e diluída (1:1000) em solução salina (NaCl a 0,9%), semeada em ágar Mueller Hinton, seguida por incubação a 36 ± 1 °C por 24 h. As colônias bacterianas foram contadas após 24 h. Todos os experimentos do tempo de morte *in vitro* foram realizados em triplicata e os resultados foram construídos através das contagens médias de colônias ($\log_{10}$ CFU/ml) *versus* tempo.

Bactericida foi definido como uma redução de 99,9% ($\geq 3 \log_{10}$) do número total de UFC/mL no inóculo original em 24 h. Bacteriostático foi definido como manutenção da concentração do inóculo original ou redução menor que 99,9% ($< 3 \log_{10}$) do número

total de UFC/ml no inóculo original em 24 h. A interação sinérgica foi definida como diminuição $\geq 2\log_{10}$ de UFC/ml entre a combinação e seu constituinte mais ativo após 24 h. A indiferença foi definida como redução de $\log_{10}$ UFC/ml na contagem de colônias em 24 h pela combinação em comparação com o agente único mais ativo. O antagonismo foi descrito como aumento $\log_{10}$ UFC/ml após 24 h entre a combinação e o agente mais ativo (Tang et al., 2017).

Microscopia Eletrônica de Varredura

O MEV foi analisado apenas nas combinações encontradas como sinérgicas pelo método *Checkerboard*. Todos os inóculos bacterianos foram ajustados na concentração de células bacterianas ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) equivalente ao padrão de turbidez de 0.5 McFarland e foram submetidos a $\times 0,5$ CIM das combinações por 8 h. Foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) e fixadas em Karnovisk (tampão fosfato 0,1 M e glutaraldeído 2,5 %) (*Sigma-Aldrich*). A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio a 1 % (*Electron Microscopy Science*) em tampão fosfato 0,1 M por 90 min e a desidratação com etanol (*Sigma-Aldrich*). Após, foi realizado o ponto crítico e montagem em *stubs* metálicos com carbono, seguida de metalização e visualização das células bacterianas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV (OLIVEIRA JÚNIOR et al. 2020).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

As células bacterianas foram investigadas apenas nas combinações consideradas sinérgicas pelo método *Checkerboard*. Todos os inóculos bacterianos foram ajustados na concentração de células bacterianas ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) equivalente ao padrão de turbidez de 0.5 McFarland, além de submetidos a $\times 0.5$ CIM das combinações por 8 h. Em seguida, foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), centrifugadas e fixadas em Karnovisk (tampão fosfato 0,1 M e glutaraldeído 2,5 %) (*Sigma Aldrich*) por 60 min, seguidas de três lavagens em tampão fosfato 0,1 M por 10 min, pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1 % (*Electron Microscopy Science*) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) por 90 min. A desidratação foi realizada com acetona (*Sigma Aldrich*) e a infiltração com resina Epon 812 (*Electron Microscopy*

Science) para realizar cortes ultrafinos, os quais foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (*Electron Microscopy Science*) e observados em microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai™ Spirit G2 BioTWIN (OLIVEIRA JÚNIOR et al. 2020).

RESULTADOS

As CIM da riparina III foram avaliadas isoladamente e em combinação com antimicrobianos de diferentes classes (penicilina, quinolonas, carbapenêmicos e polimixina) em isolados clínicos MDR. Cada experimento foi realizado contendo controle negativo e positivo, bem como cepas de controle: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 e *A. baumannii* ATCC 19606. A CIM indicou que os isolados de *S. aureus* exibiram um fenótipo resistente à oxacilina e ciprofloxacina, e *A. baumannii* foram descritos como resistentes ao meropenem; no entanto, apenas o isolado 54 foi resistente à colistina (TABELA 2), de acordo com o CLSI (2019).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima da riparina III e antimicrobianos de isolados clínicos multidroga-resistentes obtidos em hospitais públicos de Recife/Pernambuco/Brasil.

Isolados		CIM (µg/ml)				
		Riparina III	Antimicrobianos			
			OXA	CIP	MEM	CST
<i>S. aureus</i>	170	50 µg/ml	32	128	-	-
	382		32	128	-	-
	ATCC 29213		0.125	0.25	-	-
<i>A. baumannii</i>	54	400 µg/ml	-	-	128	16
	808		-	-	64	1
	ATCC 19606		-	-	-	-
<i>E. coli</i> *	ATCC 25922	-	-	-	0.03125	0.5

Legenda: CIM, Concentração Inibitória Mínima; CIP, Ciprofloxacina; CST, Colistina; MEM, Meropenem; OXA, Oxacilina; -, não se aplica. **Escherichia coli* usada para determinação da CIM, segundo o CLSI (2019).

Em seguida, os resultados foram confirmados com resazurina (20 µl) que indicou a viabilidade celular bacteriana por colorimetria. No geral, os valores da CIM da riparina III foram de 50 e 400 µg/ml em *S. aureus* e *A. baumannii*, respectivamente, e as cepas ATCC usadas para analisar a viabilidade de antimicrobianos apresentaram o ponto de corte descrito pelo CLSI (2019).

O FICI foi calculado para estimar o efeito do sinergismo. O FICI foi de 0.125 e 0.375 para *A. baumannii* 54 e 808, respectivamente, indicando forte sinergismo entre riparina III e colistina. Nenhum efeito antagonista foi observado em qualquer concentração da riparina III combinada com cada antimicrobiano. Em *S. aureus*, as combinações riparina III/oxacilina e riparina III/ciprofloxacina apresentaram efeito indiferente. Este resultado também pode ser observado na combinação riparina III/meropenem em ambas as cepas avaliadas de *A. baumannii*, e explorou-se a capacidade da riparina III em reverter a CIM da colistina nesta espécie (TABELA 3). Assim, observou-se que a riparina III pode potencializar a ação antimicrobiana da colistina nos isolados avaliados, devido à diminuição da concentração do antimicrobiano.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana da riparina III em combinação aos antimicrobianos contra isolados clínicos multidroga-resistentes de *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii*.

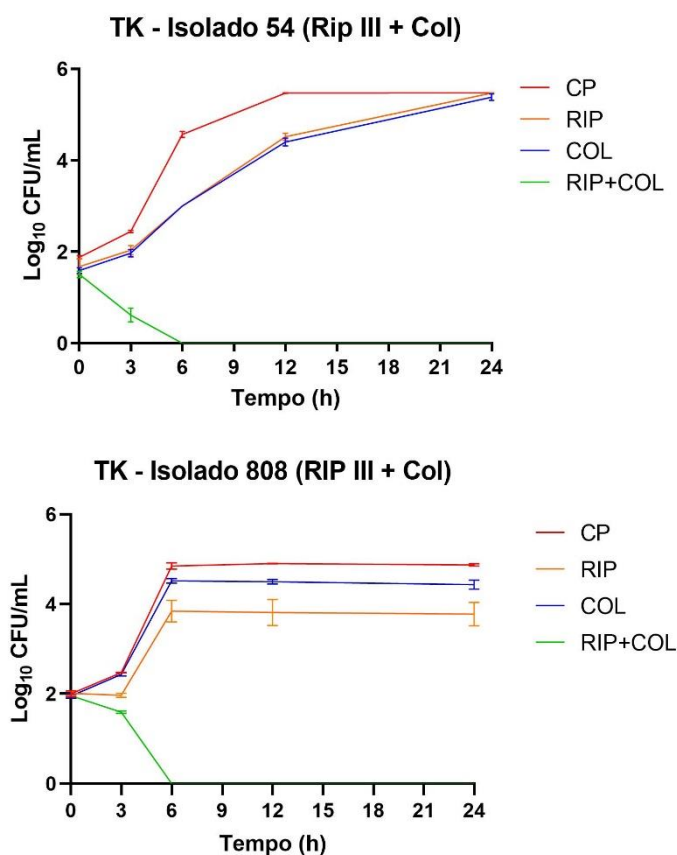
Isolados	CIM (µg/ml)							
	Riparina e Oxacilina				Riparina e Ciprofloxacina			
	RIP	OXA	FICI	TIPO DE INTERAÇÃO	RIP	CIP	FICI	TIPO DE INTERAÇÃO
170	25	0.5	0.5156	I	25	2	0.5156	I
382	25	0.5	0.5156	I	25	2	0.5156	I
Isolados	Riparina e Meropenem				Riparina e Colistina			
	RIP	MEM	FICI	TIPO DE INTERAÇÃO	RIP	CST	FICI	TIPO DE INTERAÇÃO
	RIP	MEM	FICI	TIPO DE INTERAÇÃO	RIP	CST	FICI	TIPO DE INTERAÇÃO
54	100	64	0.750	I	25	1.0	0.125	S
808	6,25	64	1.010	I	50	0.25	0.375	S

Legenda: CIM, Concentração Inibitória Mínima; RIP, Riparina III; CIP, Ciprofloxacina; CST, Colistina; MEM, Meropenem; OXA, Oxacilina; FICI, Índice da Concentração Inibitória Fracionada; S – Sinergismo; I, Indiferente.

A análise das combinações de riparina III/antimicrobiano resultaram na inibição do crescimento, revelando que, na maioria dos casos, os valores da CIM foram significativamente afetados ou moderadamente afetados. Em *A. baumannii* (54) houve uma diminuição de até 16 vezes na riparina III quanto na colistina em casos de efeito sinérgico, mostrando que a riparina a 400 µg/ml reduziu efetivamente a CIM da colistina de 16 para 1 µg/ml contra *A. baumannii*, representado por um MF de 16 vezes, enquanto a CIM de colistina em *A. baumannii* (808) foi afetada com uma diminuição de até 2 vezes de 1 para 0.25 µg/ml.

As curvas do tempo de morte foram realizadas apenas nas combinações consideradas sinérgicas pelo método *Checkerboard*. Além disso, este método foi utilizado para avaliar ainda mais o potencial de sinergia da riparina III em combinação com colistina contra dois isolados de *A. baumannii* MDR, nos quais a riparina III potencializou a ação antimicrobiana da colistina, diminuindo acentuadamente sua concentração comparada ao uso isoladamente da colistina. A combinação riparina III e colistina confirmou a ação sinérgica observada no *Checkerboard* e apresentou redução no número de UFC, quando comparada à riparina III e colistina isoladamente após 24 h na curva de controle de crescimento. Em ambos os isolados avaliados (54 e 808), observou-se crescimento constante de UFC nos tempos analisados, quando submetidos a riparina III e colistina isoladamente. Por outro lado, quando submetido à combinação, não houve crescimento de colônias bacterianas a partir do tempo 6 h na combinação (riparina III/colistina), inferindo uma ação bactericida. Em ambos os experimentos, o controle positivo apresentou crescimento correto (Figura 2) e nenhum crescimento bacteriano no controle negativo. Os valores de CIM de colistina contra *A. baumannii* MDR foram reduzidos pela adição de riparina III, o que indicou sinergia com a redução da CIM da colistina. Esses dados foram confirmados pelo tempo de morte.

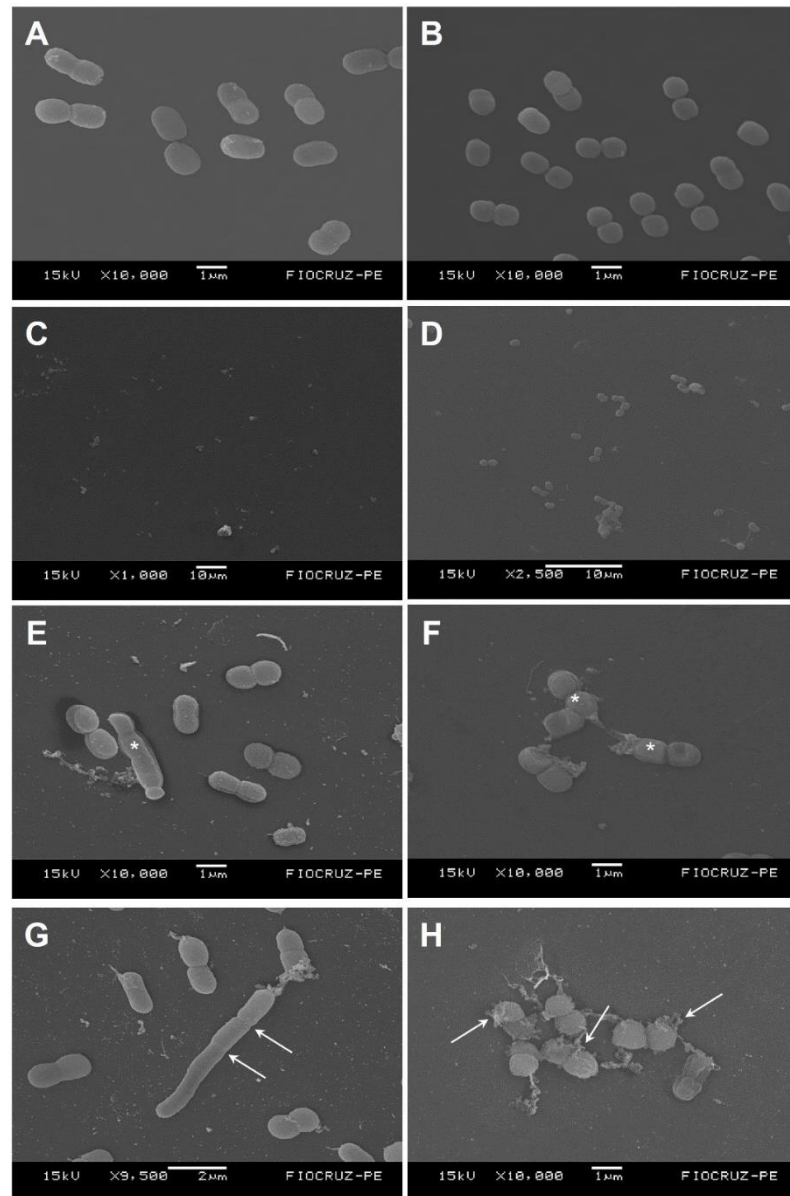
Figura 2 - Curvas do tempo de morte de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* (54 e 808) submetidos à concentração subinibitória da combinação da riparina III e colistina.



Legenda: CP, Controle Positivo; RIP III, Riparina III; CST, Colistina. Isolado 54 submetido à riparina III (12.5 µg/ml) e colistina (0.5 µg/ml). Isolado 808: submetido à riparina III (25 µg/ml) e colistina (0.125 µg/ml).

A MEV e MET foram realizadas apenas nas combinações consideradas sinérgicas pelo método *Checkerboard*. Em MEV, as células-controle de *A. baumannii* (54 e 808) apresentaram superfície intacta sem alterações morfológicas com estruturas em cocobacilos (Figura 3A-B). No entanto, para as células bacterianas submetidas à riparina III e colistina isoladamente, observou-se redução no número de células e alterações na morfologia aparente, bem como aparência rugosa/saliências na parede celular (Figura 3C-F). Além disso, foram visualizados alongamento celular sem divisão e lise celular com extravasamento de material citoplasmático (Figura 3G-H).

Fig. 3 - Alterações ultraestruturais induzidas pela ação da riparina III e colistina isoladamente, e a combinação riparina III/colistina em isolados clínicos multidroga-resistentes de *Acinetobacter baumannii* (54 e 808) por Microscopia Eletrônica de Varredura.

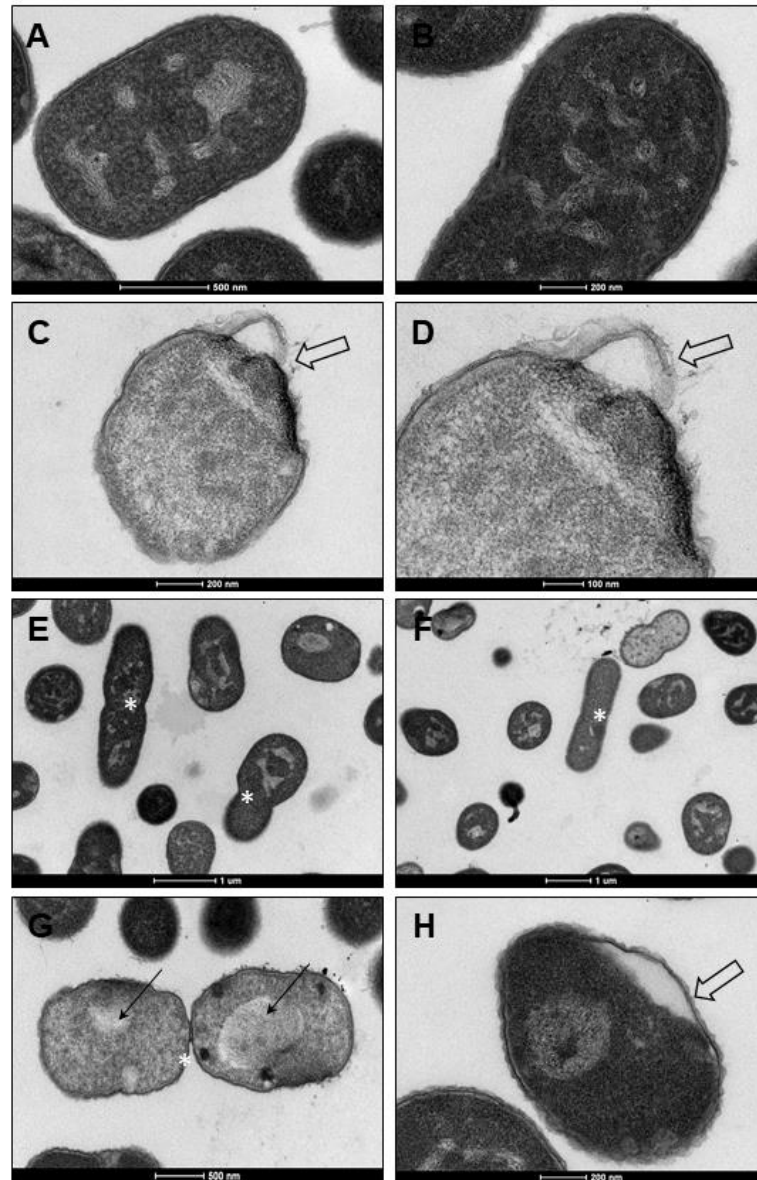


Legenda: **(A, C, E e G)** Células de *Acinetobacter baumannii* 54, **(A)** controles de *A. baumannii* com morfologia e tamanho preservados. **(C)** células submetidas à colistina (8 µg/ml) observa-se uma redução significativa no número de células bacterianas; **(E)** Células expostas à riparina III (200 µg/ml) observa-se alteração morfológica (asterisco) com aparência áspera/protuberâncias na superfície da parede celular e **(G)** células submetidas à combinação de riparina III e (12,5 µg/ml) e colistina (0,5 µg/ml) observa-se alongamento celular (setas) e ausência de formação de septo. **(B, D, F e H)** células de *Acinetobacter baumannii* 808, **(B)** controle de *A. baumannii* com morfologia e tamanho preservados. **(D)** as células submetidas à colistina (0,5 µg/ml) observe uma redução significativa no número de células bacterianas; **(F)** Células expostas à riparina III (200 µg/ml) observam-se células com morfologia alterada (asteriscos) com aparência rugosa na superfície da parede celular e **(H)** células submetidas à combinação de riparina III (25 µg/ml) e colistina (0,125 µg/ml) observa-se diversas células com morfologia alterada e extravasamento de conteúdo citoplasmático (setas).

A análise do interior das células-controle de *A. baumannii* (54) e (808) por MET revelou estruturas bem preservadas, respectivamente (Figuras 4A-B e 5A-B). Células bacterianas expostas à riparina III e à colistina isoladamente apresentam parede celular descontínua, morfologias indefinidas e heterogeneidade na densidade eletrônica (Figura 4C-F). Submetidos à combinação riparina III/colistina indicaram alteração morfológica, áreas elétron-lucentes no citoplasma e aspecto rugoso na parede celular, além de separação das camadas do envelope celular (Figura 4G-H).

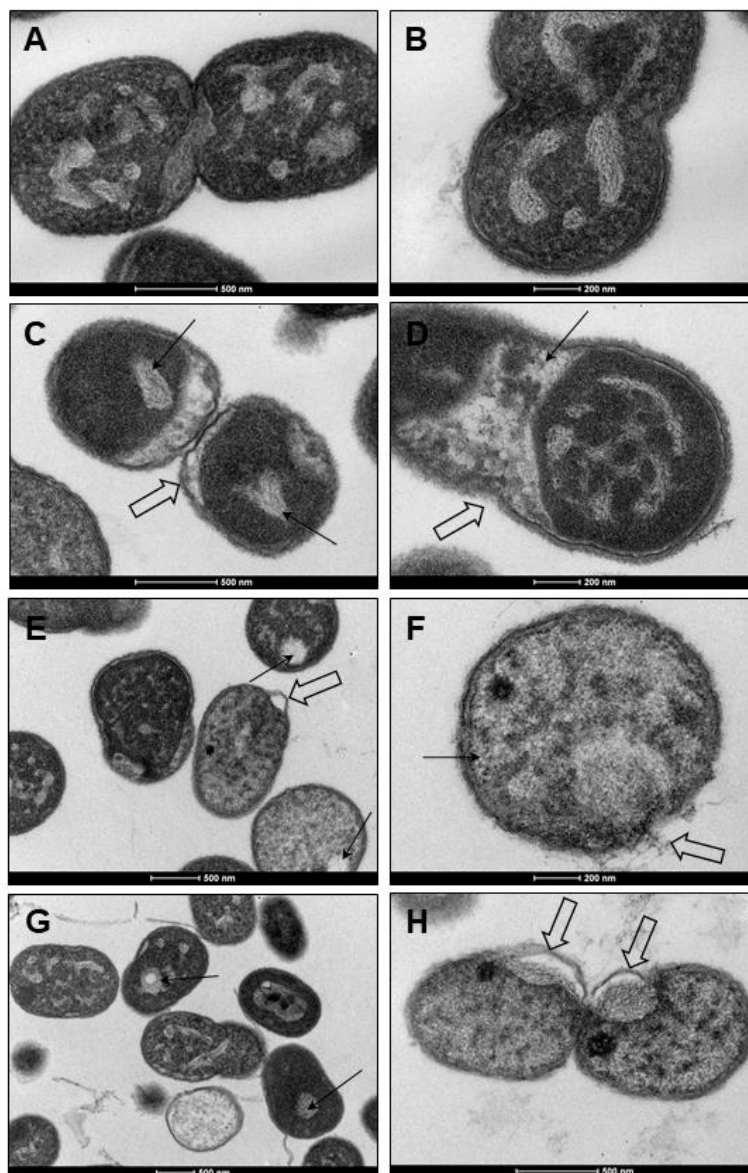
Em relação ao *A. baumannii* 808, quando submetido à riparina III e colistina isoladamente exibiu o espaço elétron-lucentes e paredes e membranas quebradas, bem como grandes vacúolos intracelulares e desfragmentação total da parede celular bacteriana (Figura 5C-F). Células bacterianas expostas à combinação riparina III/colistina apresentaram vacúolos intracelulares, zonas líticas e desfragmentação total da parede celular bacteriana, morfologia indefinida e aparência áspera na parede celular e separação das camadas do envelope celular (Figura 5G-H).

Fig. 4 - Microscopia eletrônica de transmissão de isolados clínicos multidroga-resistentes de *Acinetobacter baumannii* (54) submetidos à riparina III e colistina isoladamente e combinação de riparina III/colistina.



Legenda: **(A e B)** Célula-controle de *Acinetobacter baumannii* 54, com tamanho e morfologia preservados; **(C e D)** *A. baumannii* 54 submetido à riparina III (200 µg/ml) apresenta membrana e parede celular descontínuas (seta aberta), morfologias indefinidas e área elétron-lucentes no citoplasma; **(E e F)** *A. baumannii* 54 exposto à colistina (8 µg/ml), apresenta morfologia alterada com presença de células alongadas sem formação de septo (asterisco); **(G e H)** *A. baumannii* 54 submetido à combinação de riparina III/colistina (12,5 µg/ml/0,5 µg/ml): presença de células com alterações morfológicas (asterisco) e áreas elétron-lucentes (seta longa) no citoplasma. Observa-se também a desorganização da membrana e da parede celular (seta aberta).

Fig. 5 - Microscopia eletrônica de transmissão de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* (808) multidroga-resistentes pela ação de riparina III e colistina isoladamente, e a combinação de riparina III/colistina.



Legenda: **(A e B)** Células-controle de *Acinetobacter baumannii* 808 com tamanho e morfologia preservados; **(C e D)** *A. baumannii* 808 submetido à riparina III (200 µg/ml), as células apresentam desarranjo na membrana e na parede celular (seta aberta), além de exibirem espaços elétron-lucentes no citoplasma (seta longa); **(E e F)** *A. baumannii* 808 exposto à colistina (0,5 µg/ml), células apresentando espaços elétron-lucentes (setas longas) e total desfragmentação da membrana, e membrana e parede celular descontínuas (seta aberta); **(G e H)** *A. baumannii* 808 submetido à combinação de riparina III/colistina (25 µg/ml / 0,125 µg/ml) apresenta células com morfologia irregular, presença de espaços elétron-lucentes (setas longas), e descontinuidade da membrana e parede celular (seta aberta).

DISCUSSÃO

As plantas e seus produtos são a principal fonte de medicamentos, sendo consideradas medicina alternativa contra doenças desde a antiguidade (Subramani et al., 2017). No entanto, desde o advento dos antimicrobianos na década de 1950, o uso de produtos vegetais com ação antimicrobiana tornou-se literalmente inexistente (Cowan, 1999). Diversas pesquisas estão envolvidas em produtos vegetais como drogas, pois são substitutos indiscutíveis dos antimicrobianos prescritos na terapia clínica (Cowan, 1999; Bakal et al., 2017).

O uso de produtos vegetais tem sido amplamente discutido, devido à recorrente identificação de isolados clínicos multidroga-resistentes envolvidos em IRAS. O problema atual e ainda crescente de multidroga resistência (Farlow et al., 2019) em isolados clínicos de *S. aureus* e *A. baumannii*, e difusão de cepas de MRSA, e o perfil antimicrobiano dos compostos naturais podem ser considerados essenciais para formulações naturais (Cowan, 1999; Subramani et al., 2017). Também, não estão associados aos efeitos colaterais, são mais baratos, provêm de fontes renováveis e têm maior aceitação devido ao longo histórico de uso (Chanda e Rakholiya, 2011).

Alguns estudos descreveram a atividade antimicrobiana de compostos naturais do cálice e frutos verdes de *A. riparia* (Nees) Mez. em cepas bacterianas e fúngicas (Barbosa-Filho, 1987; Barbosa et al., 1988). Após o isolamento das riparinas I, II e III, Catão et al. (2005) inferiram sua atividade antimicrobiana em *S. aureus* e *E. coli*, e em 2010, os autores determinaram a CIM da riparina III em *S. aureus* sensível à metilicina obtida de bovinos a partir de 100 µg/ml na ATCC 25923 e 200 µg/ml em cepa 122U. Nossos dados confirmam as CIM obtidas no estudo de Oliveira Júnior et al. (2020), e foi possível determinar a CIM da riparina III em isolados clínicos MDR de *S. aureus* (50 µg/ml) e *A. baumannii* (400 µg/ml).

Um grande estudo descreve o efeito sinérgico entre os compostos naturais ou extratos e antimicrobianos por meio da triagem sistemática de compostos bioativos derivados de plantas, incluindo aqueles que podem atuar sinergicamente com antimicrobianos (Stefanović, 2017). O autor garante que os extratos de plantas possuem ações antibacterianas, podendo também aumentar a capacidade de potencializar a atividade de um antimicrobiano em combinação ao mesmo, de forma

que as bactérias se tornem sensíveis ao antimicrobiano ou o antimicrobiano atue em concentrações mais baixas.

Outros estudos indicam que o uso de produtos naturais combinados com antimicrobianos promove uma redução significativa da CIM de antimicrobianos para cepas bacterianas (Fazly Bazzaz et al., 2016; Moussaoui e Alaoui, 2016; Sanhueza et al., 2017; Cannatelli et al., 2018; Silva et al., 2019). O presente estudo confirma esse achado ao analisar a riparina III, uma alcanida natural, obtida do fruto verde ou cálice de *A. riparia* (Ness) Mez., e antimicrobianos convencionais isolados e combinados; portanto, pode-se inferir que a associação riparina III e colistina é bastante eficaz *in vitro* contra *A. baumannii*, devido à ação sinérgica e diminuição significativa da CIM do antimicrobiano e do composto natural.

Sabe-se que a monoterapia e a terapia antimicrobiana combinada são amplamente utilizadas contra infecções bacterianas (Firmo et al., 2020). Apesar da ampla gama de aplicações, os antimicrobianos podem apresentar algumas desvantagens, que se limitam ao aumento da resistência, neurotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Nation; Li, 2009; Roberts et al., 2015; Tuon et al., 2015; Baloch et al., 2015; al., 2017; Eljaaly et al., 2018; Rutter e Burgess, 2018). Desta forma, nosso estudo confirma a importância do uso da combinação colistina e riparina III, dada a baixa toxicidade *in vitro* deste composto natural, conforme confirmado em estudo anterior sobre a riparina III (Oliveira Júnior et al., 2020).

Embora a análise dos mecanismos de ação seja essencial na busca de novas moléculas para uso terapêutico, é importante ressaltar que a ação sinérgica existente entre compostos naturais e antimicrobianos são determinantes em seus efeitos. Assim, comparar a ação de compostos naturais com antimicrobianos é uma abordagem adequada para determinar sua eficácia (Bona et al., 2019). Além disso, Cannatelli et al. (2018) garantem que a atividade antimicrobiana sinérgica não parece ser dependente da espécie ou do mecanismo de resistência. Nesse sentido, podemos inferir que a riparina III pode potencializar a ação antimicrobiana da colistina contra *A. baumannii* MDR.

Kaur et al. (2018) analisaram o potencial da curcumina em combinação com antimicrobianos, incluindo colistina, contra *A. baumannii* MDR. Observou-se que a combinação deste composto e colistina reduziu efetivamente a CIM da colistina de 2 para 0,5 µg/ml, representada por MF 4. Outros estudos descrevem uma diminuição da

CIM da colistina quando associada a algum composto natural. Nossos dados demonstram uma diminuição muito significativa na combinação de riparina e colistina em ambos os isolados bacterianos analisados; no entanto, o isolado 54 exibe MF 16 vezes. Esses dados foram confirmados pelo cálculo do MF ($CIM_{sozinho}/CIM_{combinado}$).

Liu et al. (2016) observaram um efeito sinérgico de meropenem e colistina contra todos os doze isolados de *A. baumannii* com FICI $\leq 0,5$. Por outro lado, neste estudo, o FICI foi de 0,125 e 0,375 para *A. baumannii* 54 e 808, respectivamente, na combinação riparina III e colistina. Isso demonstra que mais estudos com compostos naturais associados a antimicrobianos devem ser realizados.

Houve um aumento nos relatos de infecções causadas por algumas bactérias, como *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (Falagas et al., 2006; Kurihara et al., 2020; Perez et al., 2020; Zuniga-Moya et al., 2020; Rangel et al., 2021), desenvolvendo resistência às polimixinas em um processo denominado resistência adquirida, enquanto outras bactérias, como *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp. e *Morganella* spp. são naturalmente resistentes a essas drogas (Olaitan et al., 2014). Assim, há urgência em otimizar o uso clínico da polimixina, projetando terapias combinadas eficazes (Falagas et al., 2006).

Além disso, uma vez que a eficácia da monoterapia com colistina é baixa contra isolados resistentes à colistina (Kwa et al., 2007), uma terapia combinada de colistina e riparina III pode sugerir análise *in vivo* devido aos resultados significativos na terapia combinada neste estudo.

Diversos estudos demonstram alterações ultraestruturais em células bacterianas causadas pela combinação de antimicrobianos. Cushnie et al. (2016) descrevem as possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais em células bacterianas induzidas por antissépticos, desinfetantes e drogas antibacterianas. Assim, inúmeras alterações ultraestruturais corroboram as características observadas pela combinação riparina III e colistina contra *A. baumannii*, como aspecto rugoso/protuberâncias na parede celular, alongamento celular sem divisão, vacúolos intracelulares e zonas líticas.

Fam et al. (2017) indicaram a presença de “balonismo” e distensão das células ao rompimento e lise celular com extravasamento de material citoplasmático após sua exposição à combinação de doripenem e colistina. Outro estudo analisou as combinações IVIG/meropenem, IVIG/colistina, IVIG/amicacina, meropenem/colistina

e meropenem/amicacina, e diversas alterações ultraestruturais foram observadas, incluindo ruptura e alongamento celular, depressão na superfície da membrana, células irregulares, divisão celular incompleta, depressão celular na superfície da membrana e enrugamento na superfície celular (Lima et al., 2020). Um estudo anterior (Oliveira Júnior et al., 2020) descreve as possíveis alterações ultraestruturais causadas apenas pela riparina III, tais como: células alongadas sem visualização do septo bacteriano, células numerosas com estrutura rugosa na superfície celular. Este estudo corrobora os estudos citados, inferindo que a combinação riparina III e colistina é eficaz contra *A. baumannii*, que apresenta inúmeras alterações ultraestruturais, tais como: alongamento celular sem divisão e lise celular com extravasamento de material citoplasmático.

Portanto, este é o primeiro relato a investigar o efeito combinatório da riparina III com antimicrobianos convencionais em isolados clínicos MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*, bem como Fator de Modulação (MF), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Transmissão (MET).

CONCLUSÃO

A análise da combinação de riparina III e colistina mostrou uma excelente atividade sinérgica contra *A. baumannii* MDR, bem como uma diminuição bastante significativa na CIM da colistina, o que é importante devido ao seu alto potencial citotóxico. Além disso, essa combinação provocou inúmeras alterações ultraestruturais nas células bacterianas. Esses dados são bastante relevantes, dado o crescente desenvolvimento de resistência antimicrobiana por agentes bacterianos envolvidos nas IRAS.

Assim, este estudo demonstrou o potencial terapêutico da combinação entre riparina III e colistina contra *A. baumannii*, sugerindo estudos adicionais, incluindo análises *in vivo* e ensaios clínicos, e podemos concluir que o uso de compostos naturais associados a antimicrobianos pode ter um efeito promissor sobre agentes bacterianos, indicando uma nova opção de tratamento para infecções multidroga-resistentes.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez e ao Dr. José Maria Barbosa-Filho que gentilmente cederam os produtos avaliados neste estudo. Este trabalho foi apoiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Rennofito/CNPq (Processo nº 465.536/2014-0) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Este trabalho foi desenvolvido no Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz/Pernambuco/Brasil) e Instituto Keizo Asami (iLIKA/Universidade Federal de Pernambuco/Brasil).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram nenhum conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Aleksic, V. et al., 2014. Synergistic effect of *Myrtus communis* L. essential oils and conventional antibiotics against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates. *Phytomedicine*. 21(12):1666-1674. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.08.013>.
2. Araújo, E.J.F. et al., 2016. In vitro antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkamides from *Aniba riparia* (Lauraceae). *Acta Amazon*. 46(3):309-314. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201505436>
3. Bakal, S.N., Bereswill, S., Heimesaat, M.M., 2017. Finding novel antibiotic substances from medicinal plants - antimicrobial properties of *Nigella sativa* directed against multidrug-resistant bacteria. *Eur J Microbiol Immunol*. 7(1): 92-98. <https://doi.org/10.1556/1886.2017.00001>.
4. Barbosa-Filho, J.M. et al. 1987. Benzoyl esters and amides, stryrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry*. 26(9):2615-2617. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83890-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83890-X)
5. Barbosa, R.C.S.B.C. et al. 1988. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. *Acta Amazon*. 8(1/2):91-94. Suplemento. <https://doi.org/10.1590/1809-43921988185094>

6. Bardbari, A.M. et al. 2018. Highly synergistic activity of melittin with imipenem and colistin in biofilm inhibition against multidrug-resistant strong biofilm producer strains of *Acinetobacter baumannii*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 37(3):443-454. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3189-7>
7. Baloch, Z.Q. et al. 2017. Ciprofloxacin-induced hepatotoxicity in a healthy young adult. Cureus. 9(2): e1016. <https://doi.org/10.7759/cureus.1016>
8. Bhatta, D.R. et al. 2019. Burden of multidrug resistant respiratory pathogens in intensive care units of tertiary care hospital. Asian J Med Sci. 10(2):14-19. <https://doi.org/10.3126/ajms.v10i2.21098>
9. Bona, G.S. et al. 2019. Dual mode of action of grape cane extracts against *Botrytis cinerea*. J. Agric Food Chem. 67(19):5512-5520. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07098>
10. Bush, K. et al. 2014. Tackling antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. 9(12):894-896. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2693>
11. Cannatelli, A. et al. 2018. Synergistic activity of colistin in combination with resveratrol against colistin-resistant Gram-negative pathogens. Front Microbiol. 7;9:1808. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01808>
12. Catão, R.M.R. et al. 2005. Evaluation of the antimicrobial activity about multiresistents samples of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Rev Bras Anál Clín. 37(4): 247-249.
13. Catão, R.M.R. et al. 2010. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Anál Clin. 42(1): 09-14.
14. Chanda, S., Rakholiya, K., 2011. Combination therapy: synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz/ Spain: Formatex, p. 520-529.
15. Chen, Y. et al. 2019. Clinical characteristics, risk factors, immune status, and prognosis of secondary infection of sepsis: a retrospective observational study. BMC Anesthesiol. 19(1):185. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12871-019-0849-9>
16. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29^a ed. CLSI suplemento M100. Wayne PA: Clinical & Laboratory Standards Institute, 2019.

17. Correa, M.S. et al., 2019. Antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil from dried leaves of *Eucalyptus staigeriana*. Arq. Inst. Biol, 86: 1-8, e0202018. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000202018>
18. Coronado-Álvarez, N.M., Parra, D., Parra-Ruiz, J. 2019. Clinical efficacy of fosfomycin combinations against a variety of gram-positive cocci. Enferm Infecc Microbiol Clin. 37(1):4-10. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.05.009>
19. Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 12:564–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
20. Cushnie, T.P.T., O'Driscoll, N.H., Lamb, A.J. 2016. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. Cell Mol Life Sci. 73(23):4471-4492. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2302-2>
21. Dabaja-Younis, H. et al. 2021. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Israeli children: community- vs hospital-acquired or healthcare related infections. Acta Paediatr. 110(1):210-218. <https://doi.org/10.1111/apa.15393>
22. De Oliveira, D.M.P. et al. 2020. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. Clin Microbiol Rev. 13;33(3):e00181-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>
23. Eljaaly, K., Alshehri, S., Erstad, B.L. 2018. Systematic review and meta-analysis of the safety of antistaphylococcal penicillins compared to cefazolin. Antimicrob Agents Chemother. 62(4). pii: e01816-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01816-17>
24. El Mekes, A. et al. 2019. The clinical and epidemiological risk factors of infections due to multi-drug resistant bacteria in an adult intensive care unit of University Hospital Center in Marrakesh-Morocco. J Infect Public Health. 16, pii: S1876-0341(19)30292-8. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.08.012>
25. Falagas, M.E., Koletsis, P.K., Bliziotis, I.A. 2006. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol, 55(Pt 12): 1619-1629. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46747-0>
26. Fam, N. et al. 2017. Antimicrobial efficacy of doripenem colistin combination on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates by E-test agar dilution and ultrastructural methods. Egypt J Med Microbiol, 26(1):1-7. <https://doi.org/10.12816/0046266>

27. Farlow, J. et al. 2019. Comparative genomic analysis of four multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* from the country of Georgia. J Glob Antimicrob Resist. pii: S2213-7165(19)30294-2. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.11.002>
28. Fazly Bazzaz, B.S. et al. 2016. Effect of catechins, green tea extract and methylxanthines in combination with gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: combination therapy against resistant bacteria. J Pharmacopuncture. 19:312-8. <https://doi.org/10.3831/KPI.2016.19.032>
29. Firmo, E.F. et al. 2020. In vitro activity of polymyxin B in combination with meropenem, amikacin and gentamicin against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates co-harboring aminoglycoside-modifying enzymes, blaNDM-1 and blaKPC-2. J Glob Antimicrob Resist. 22:511-514. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.04.014>
30. Kaur, A., Sharma, P., Capalash, N. 2018. *Curcumin alleviates* persistence of *Acinetobacter baumannii* against colistin. Sci Rep. 8(1):11029. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29291-z>
31. Kim, B., Kim, K., Yoon, J.S. 2020. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infection in children in adult versus pediatric intensive care units. Pediatr Int. 62(4):451-458. <https://doi.org/10.1111/ped.14133>
32. Kurihara, M.N.L et al. 2020. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks: a global problem in healthcare settings. Rev Soc Bras Med Trop, 53:(e20200248). <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0248-2020>
33. Kwa, A. et al. 2007. Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 5, 811-821. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.5.811>
34. Lee, W.X., Basri, D.F., Ghazali, A.R. 2017. Bactericidal effect of pterostilbene alone and in combination with gentamicin against human pathogenic bacteria. Molecules. 17;22(3). <https://doi.org/10.3390/molecules22030463>
35. Lima, F.C.G. et al. 2020. Ultrastructural changes caused by the combination of intravenous immunoglobulin with meropenem, amikacin and colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Microb Pathog, 149: 104437. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104437>
36. Liu, X. et al. 2016. Synergistic killing by meropenem and colistin combination of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Chinese patients in an

- in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Inter J Antimicrob Agents*, 48(5):559-563. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.07.018>
37. Malafaia, C.B. et al. 2018. Effects of Caatinga plant extracts in planktonic growth and biofilm formation in *Ralstonia solanacearum*. *Microb Ecol*, 75:555–561. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1073-0>
 38. Marchese, A. et al. 2018. The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies, and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling*. 34(6):630-656. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1480756>
 39. Moellering, R. C. Jr. 1983. Rationale for use of antimicrobial combinations. *Am. J. Med.* 75, 4-8. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(83\)90088-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(83)90088-8)
 40. Moussaoui, F., Alaoui, T. 2016. Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*, 6(1): 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.024>
 41. Nation, R.L., Li. J. 2009. Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis.* 22(6):535-43. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328332e672>
 42. Odds, F.C. 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 52(1):1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
 43. Olaitan, A.O., Morand, S., Rolain, J.M. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 5, 643. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
 44. Oliveira Júnior, J.B. et al. 2020. Antimicrobial activity and biofilm inhibition of riparins I, II and III and ultrastructural changes in multidrug-resistant bacteria of medical importance. *Microb Pathog*, 149: 104529. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104529>
 45. Palomino, J. C. et al. 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(8): 2720-2722. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>
 46. Park, G.C. et al. 2016. In vitro interactions of antibiotic combinations of colistin, tigecycline, and doripenem against extensively drug-resistant and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Lab Med.* 36(2):124-30. <https://doi.org/10.3343/alm.2016.36.2.124>

47. Perez, S. et al. 2020. Increase in hospital-acquired carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection and colonization in an acute care hospital during a surge in COVID-19 admissions - New Jersey, February-July 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 4;69(48):1827-1831. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6948e1>
48. Rangel, K., Chagas, T.P.G., De-Simone, S.G. 2021. *Acinetobacter baumannii* infections in times of COVID-19 pandemic. Pathogens, 10(8): 1006. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081006>
49. Roberts, K.D. et al. 2015. Antimicrobial activity and toxicity of the major lipopeptide components of polymyxin b and colistin: last-line antibiotics against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. ACS Infect Dis. 1(11):568-575. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00085>
50. Rutter, W.C., Burgess, D.S. 2018. Incidence of acute kidney injury among patients treated with piperacillin-tazobactam or meropenem in combination with vancomycin. Antimicrob Agents Chemother. 62(7). pii: e00264-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00264-18>
51. Sanhueza, L. et al. 2017. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. PLoS One. 12(2):e0172273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172273>
52. Song, M. et al. 2021. Plant natural flavonoids against multidrug resistant pathogens. Adv. Sci. 8: 2100749. <https://doi.org/10.1002/advs.202100749>
53. Stepanović, S. et al. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods, 40(2): 175-179. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6)
54. Subramani, R., Narayanasamy, M., Feussner, K.D. 2017. Plant-derived antimicrobials to fight against multidrug-resistant human pathogens. 3 Biotech. 7(3):172.
55. Silva, D.M. et al. 2019. Plant extracts display synergism with different classes of antibiotics. An Acad Bras Cienc. 91(2): e20180117. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0848-9>
56. Sulieman, A.M.E. et al. 2017. Evaluation of antimicrobial and synergistic effects of selected medicinal plants of Hail area with antibiotics. Biosci. Biotech. Res. Comm. 10(1): 44-50. <http://dx.doi.org/10.21786/bbrc/10.1/7>

57. Tang, H.J. et al. 2017. Cephalosporin-glycopeptide combinations for use against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates: enhanced in vitro antibacterial activity. Front Microbiol. 8:884. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00884>
58. Torres, C.A. et al. 2016. Antibacterial synergism of extracts from climbers belonging to Bignoniaceae family and commercial antibiotics against multi-resistant bacteria. J Herbal Medicine. 8, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.02.002>
59. Tuon, F.F., Rocha, J.L., Merlini, A.B. 2015. Combined therapy for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection - is there evidence outside the laboratory? J Med Microbiol. 64(9):951-9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000144>
60. Tyers, M., Wright, G.D. 2019. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. Nat Rev Microbiol. 17(3):141-155. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0141-x>
61. van Duin, D., Paterson D.L. 2016. Multidrug-resistant bacteria in the community: trends and lessons learned. Infect Dis Clin North Am. 30(2):377-390. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>
62. Wang, Y. et al. 2019. In vitro and in vivo assessment of the antibacterial activity of colistin alone and/or in combination with other antibiotics against *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli*. J Glob Antimicrob Resist. 23. pii: S2213-7165(19)30246-2. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.013>
63. Wentao, N. et al. 2018. In vitro activity of minocycline combined with aminoglycosides against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. J Antibiot (Tokyo). 71(5):506-513. <https://doi.org/10.1038/s41429-017-0024-9>
64. WHO, World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. Available in: <https://www.aidsdatahub.org/sites/default/files/resource/who-global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria.pdf> Access in: 25 dez. 2019.
65. Wongsurakiat, P., Chitwarakorn, N. 2019. Severe community-acquired pneumonia in general medical wards: outcomes and impact of initial antibiotic selection. BMC Pulmonary Medicine. 19(1):179. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-0944-1>
66. Wright, G.D. 2017. Opportunities for natural products in 21(st) century antibiotic discovery. Nat. Prod. Rep. 34, 694-701. <https://doi.org/10.1039/c7np00019g>

67. Zhou, Y. et al. 2018. Pterostilbene, a potential MCR-1 inhibitor that enhances the efficacy of polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 62(4). pii: e02146-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02146-17>
68. Zhu, W. et al. 2018. In vitro evaluation of antimicrobial combinations against imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of different MICs. *J Infect Public Health.* 11(6):856-860. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.07.006>
69. Zuniga-Moya, J.C. et al. 2020. Antimicrobial profile of *Acinetobacter baumannii* at a tertiary hospital in Honduras: a cross-sectional analysis. *Rev Panam Salud Publica,* 44:e46. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.46>

Artigo 2: Inibição e erradicação *in vitro* de biofilme de *Acinetobacter baumannii* multidroga-resistente pela combinação de riparina III e colistina. **Revista:** Microbial Pathogenesis. **Fator de Impacto:** 3.848. **Qualis:** A3.

In vitro inhibition and eradication of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* biofilms by riparin III and colistin combination

Dear Dr Oliveira Junior,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Microbial Pathogenesis. It has been assigned the following manuscript number: YMPAT-D-23-00416.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/ympat/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Microbial Pathogenesis

RESUMO

Acinetobacter baumannii permanece como o principal patógeno emergente amplamente associado às Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) persistentes e recorrentes; além disso, a resistência bacteriana e os fatores de virulência, como a formação de biofilme, contribuem para sua capacidade de sobreviver por longos períodos em ambientes hospitalares. O uso de terapia combinada de antimicrobianos é uma escolha eficaz para tais infecções; no entanto, fatores como resistência antimicrobiana e toxicidade comprometem a ação antimicrobiana. Assim, diversos estudos *in vitro* demonstraram um efeito sinérgico entre antimicrobianos e produtos naturais contra os biofilmes produzidos por isolados clínicos multidroga-resistentes (MDR) de *A. baumannii*. A riparina III, que é uma alcalamida natural obtida da *Aniba riparia* (Nees) Mez., possui diversas atividades biológicas, incluindo alto potencial antimicrobiano. Assim, este estudo teve como objetivo analisar a inibição e erradicação de biofilmes MDR de *A. baumannii* pela combinação de riparina III e colistina, bem como possíveis alterações ultraestruturais. A associação riparina III/colistina nas concentrações sinérgicas apresentou baixo percentual hemolítico variando de 5.74% a 6.19%. Os isolados clínicos avaliados foram descritos como fortes formadores de biofilme; contudo, a combinação sinérgica de riparina III/colistina promoveu a inibição e erradicação do biofilme, além disso, foi possível observar diversas alterações ultraestruturais no biofilme, como células alongadas e morfologia semelhante a cocos, bem como a destruição parcial ou total da matriz extracelular do biofilme e células com extravasamento de material citoplasmático. Assim, a associação riparina III/colistina apresenta baixo percentual hemolítico e ação inibitória e erradicatória sobre o biofilme de *A. baumannii* MDR, podendo promover diversas alterações ultraestruturais, indicando uma alternativa potencial para fins terapêuticos.

Palavras-chave: *Aniba riparia*, Sinergismo, *Acinetobacter baumannii*, Biofilme, Microscopia eletrônica.

INTRODUÇÃO

O complexo *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* é um grupo bacteriano descrito como o mais frequente de importância médica (Hsieh et al., 2014; Zeng et al., 2020), e *A. baumannii* emergindo como um patógeno oportunista em infecções persistentes e recorrentes em todo o mundo. Este aumento de *A. baumannii* representa uma ameaça significativa para a saúde pública (Mea; Yong; Wong, 2021; Zhu; Huang; Yang, 2022); além disso, esta espécie foi incluída na lista de patógenos prioritários globais (categoria crítica) resistentes a antimicrobianos (OMS, 2017; Mulani et al., 2019; de Oliveira et al., 2020).

Normalmente, *A. baumannii* pode colonizar a pele, orofaringe e trato gastrointestinal sem causar infecções (Maragakis; Perl, 2008), mas em pacientes imunocomprometidos pode causar infecções no sistema nervoso central, pele, tecidos moles, trato urinário, feridas cirúrgicas e ossos, além de endocardite, meningite secundária e infecção da corrente sanguínea (Peleg; Seifert; Paterson, 2008); no entanto, também pode estar envolvida em infecções por contaminação de equipamentos hospitalares com disseminação clonal, além de alto custo e taxa de mortalidade (Young et al., 2007; Giske et al., 2008; Bigot; Salcedo, 2017; Fam et al., 2008). , 2017; Maifiah et al., 2017; Pasanen et al., 2014, Chen et al., 2018; Ahmad et al., 2019; Haeili et al., 2018; Moubareck; Halat, 2020; Snyman et al., 2020 ; Zheng et al., 2020).

A incidência de *A. baumannii* bastante elevada nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (Spellberg; Rex, 2013; Zilberberg et al., 2016), devido à resistência antimicrobiana e virulência, além da capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo em ambientes hospitalares, principalmente cateteres e equipamentos respiratórios (Kyriakidis et al., 2021), bem como superfícies bióticas ou na presença de antimicrobianos e fagócitos (Macedo; Abraham, 2009; Otto, 2013; Eriksson et al., 2017), limitando a terapia (Mea; Yong; Wong, 2021).

Geralmente, esta adaptação de *A. baumannii* implica no desenvolvimento de biofilmes. Estudos anteriores descrevem que 45-73% dos *A. baumannii* multidroga-resistentes (MDR) foram capazes de formar biofilme e, os estudos têm se concentrado em sua virulência e patogênese (Mea; Yong; Wong, 2021; Domenico et al., 2017; Rao et al., 2008; Rodríguez-Bano et al., 2008; Marti et al., 2011; Yang et al., 2019;

Babapour et al., 2016). Recentemente houve a reintrodução da “velha geração” de antimicrobianos, como a polimixina E (ou colistina) como a última linha de terapia para controlar o crescimento de infecções por *A. baumannii* MDR (Asif et al., 2018; Pacheco et al., 2019; Doi et al., 2015; Lee et al., 2017; Zhang et al., 2017; Chou et al., 2019; Al-Kadmy et al., 2020; Zheng et al., 2020); no entanto, há relatos de cepas resistentes à colistina (Kontopoulou et al., 2010; Cai et al., 2012; Spanu et al., 2012; Snyman et al., 2020).

A falta de novos antimicrobianos para o tratamento de infecções por *A. baumannii* MDR está promovendo a busca por produtos naturais associados aos antimicrobianos para fins terapêuticos. Diversos estudos sobre fitomoléculas foram analisados (Aleksic e Knezevic, 2014; Liu et al., 2015; Bandeira Júnior et al., 2018), como a riparina III isolado (Catão et al., 2005; 2010; Oliveira Júnior et al., 2020) e associada aos antimicrobianos (Oliveira Júnior et al., 2023). Esta principal alcalamida natural é obtida do fruto verde e cálice da *Aniba riparia* (Nees) Mez., representando 34% do total de compostos extraídos (Barbosa-Filho et al., 1987).

O uso tradicional de *A. riparia* (Nees) Mez. não está registrado na literatura; entretanto, atividades biológicas *in vitro* têm sido demonstradas: espasmolítica (Castelo-Branco et al., 1991; Thomas et al., 1994), antimalárica, esquistossomicida e moluscicida (Castelo-Branco, 1992), relaxante muscular (Thomas et al., 1994), antimicrobiano (Barbosa-Filho et al., 1987; Barbosa et al., 1988; Marques, 2001; Catão et al., 2005; 2010; Oliveira Júnior, 2020; 2023), ansiolítico (Melo et al., 2006), antidepressivo (Melo et al., 2013; Vasconcelos et al., 2015) e antibiofilme (Oliveira Júnior, 2020). Catão et al. (2010) verificaram a eliminação do plasmídeo de resistência à penicilina na cepa de *S. aureus* e alteração na expressão de fatores de virulência por riparina III. No estudo de Oliveira Júnior et al. (2020) foi confirmada a atividade antimicrobiana da riparina III contra isolados MDR de *S. aureus* e *A. baumannii*, bem como foi determinado um alto potencial para inibir a formação de biofilme *in vitro* em *S. aureus*; além disso, observou-se diminuição da CIM (Concentração Inibitória Mínima) da colistina quando associada à riparina III contra isolados MDR de *A. baumannii* (Oliveira Júnior et al., 2023).

É relevante ressaltar o importante papel da análise de citotoxicidade, pois fornece o potencial de atividade terapêutica de compostos naturais (Pailard et al., 1999). Essa técnica permite verificar a capacidade de induzir a lise da membrana

celular, além de ser a primeira etapa dos ensaios *in vitro*, observando as concentrações e os tempos de incubação adequados (Bunel et al., 2014). Oliveira e colaboradores (2017) confirmam que um composto natural que exibe alta concentração citotóxica *in vitro*, não garante dados semelhantes *in vivo*.

Diversos estudos afirmam o efeito sinérgico *in vitro* de combinações de antimicrobianos e produtos naturais contra biofilmes de *A. baumannii* MDR (Liu et al., 2015; Purkait et al., 2020; Kerekes et al., 2013; Bag et al., 2017; Shi; Shi, 2022; Zhao et al., 2022). Assim, este estudo teve como objetivo analisar a inibição e erradicação de biofilmes de *A. baumannii* MDR pela combinação de riparina III e colistina, bem como possíveis alterações ultraestruturais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção da riparina III

A riparina III, quimicamente conhecida como *(O-methyl)-N-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina* ou *N-[8'-(4'-methoxyphenylethyl)]-2,6-dihidroxi-benzoilamida*, é uma alcalamida natural isolada do fruto verde da *Aniba riparia* (Ness) Mez. (Lauraceae) através da síntese orgânica (Barbosa-Filho et al. 1987). Este composto é o principal componente molecular, representando um total de 34% dos componentes extraídos (Barbosa-Filho et al. 1987), e foi estocado em recipiente apropriado sem contato direto com luz à 23 °C.

Agentes antimicrobianos

A riparina III foi utilizada para teste em associação com polimixina E (ou colistina) Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Soluções de antimicrobianos foram preparadas de acordo com o CLSI (2019) e estocados em temperatura especificada pelo fabricante.

Isolados bacterianos multidroga-resistentes

A riparina III e colistina foram testadas contra isolados de *A. baumannii* MDR obtidos de hospitais públicos em Recife/Pernambuco/Brasil por demanda espontânea e vigilância (Oliveira Júnior et al., 2023). Sua identificação e determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos foram adquiridas por VITEK-2 (Biomérieux), seguida por confirmação laboratorial. Cepas bacterianas foram ativadas com 30 µL do estoque, adicionados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) para enriquecimento microbiano e incubadas por 18-24 h em estufa bacteriológica a 36 ± 1 °C. Em seguida, foram semeados em ágar BHI e incubadas a 36 ± 1 °C por 18-24 h para cultivo e isolamento bacteriano. A concentração de células bacterianas (10^8 UFC/mL), ajustadas para o padrão de turbidez por escala 0.5 McFarland.

Teste de hemólise

A atividade hemolítica foi avaliada somente com a concentração sinérgica entre riparina III e colistina (Oliveira Júnior et al., 2023) através do método descrito por Becerra et al. (2012). A riparina III e colistina foram diluídas em solução salina (0.85% NaCl e 10 nM CaCl_2) em placas de 96 poços. Em seguida, 2 mL de sangue homogeneizado foram dissolvidos em solução salina, centrifugados a 2.500 rpm por 2 min e incubados por 3 h a 36 ± 1 °C sob agitação constante.

Um controle positivo de lise celular (1% Triton X-100 - Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) e um controle negativo (células em solução salina) foram adicionados. Após incubação, as placas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 4 min a 23 °C, e o sobrenadante foi removido para outra placa e realizada a leitura da absorbância a 540 nm (Benchmark plus, Bio-Rad®, California, EUA). Este teste foi realizado em dois experimentos independentes e em quadruplicata.

Formação de biofilme

O biofilme foi quantificado por meio das metodologias descritas por Stepanović et al. (2000) e Anbazhagan et al. (2012) com adaptações. Em placas de 96 poços, foram adicionados 200 µL de suspensão bacteriana, incubadas por 24 h a 36 ± 1 °C.

As suspensões foram removidas, e as placas foram incubadas por 40-60 min a 60 ± 1 °C. Após, foram adicionados 200 µL de cristal violeta por 15 min, seguido por lavagem em imersão em água. Logo, 200 µL de etanol absoluto foram adicionados na placa por 30 min, seguido por leitura de absorbância a 570 nm em espectrofotômetro (Benchmark plus, Bio-Rad®, California, USA). Cada isolado foi classificado por densidade óptica (DO) como: não aderente ($DO_i \leq DO_c$), fracamente aderente ($DO_c < DO_i < 2x DO_c$), moderadamente aderente ($2x DO_c < DO_i \leq 4x DO_c$), ou fortemente aderente ($4x DO_c < DO_i$) baseado em sua absorbância (Stepanović et al., 2000).

Inibição e erradicação do biofilme

A inibição e erradicação do biofilme foram adaptadas das metodologias de Stepanović et al. (2000) e Anbazhagan et al. (2012). A inibição do biofilme foi realizada em placa de 96 poços com a adição de 200 µL da solução contendo a combinação de riparina III/colistina na concentração subinibitória (Oliveira Júnior et al., 2023), suspensão bacteriana (10^8 CFU/mL), lamínula e 0.5 cm de cateter estéril. Após a incubação por 24 h a 36 ± 1 °C, a lamínula e o cateter foram removidos cuidadosamente para subsequente análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise da erradicação do biofilme ocorreu após a incubação para a formação do biofilme (24 h a 36 ± 1 °C) submetido à combinação de riparina III/colistina na concentração subinibitória (Oliveira Júnior et al., 2023), suspensão bacteriana (10^8 CFU/mL), lamínula e 0.5 cm de cateter estéril, seguido por remoção cuidadosa para análise por MEV.

Em seguida, o volume foi removido, e o cristal violeta foi adicionado por 15 min e lavado por imersão em água. Um volume de 200 µL de álcool absoluto foi adicionado por 30 min, seguido por leitura espectrofotométrica a 570 nm (Benchmark plus, Bio-Rad®, California, USA) e classificados de acordo com a densidade óptica (Stepanović et al., 2000).

Microscopia eletrônica de varredura

Isolados clínicos de *A. baumannii* MDR, lamínulas e 0.5 cm de cateter estéril foram expostos à concentração subinibitória por 18 h (Oliveira Júnior et al., 2023), os

quais foram lavados com tampão fosfato a 0.1 M (pH 7.4) para fixação por Karnovisk (tampão fosfato a 0.1 M e a glutaraldeído a 2.5%) (Sigma-Aldrich). A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio a 1% (Electron Microscopy Science) em tampão fosfato a 0.1 M por 90 min. Eles foram lavados com tampão fosfato a 1% para desidratação com etanol (Sigma-Aldrich). Após, o ponto crítico e montagem em *stubs* de metal foram realizados usando dupla fita de carbono, metalização e visualização das células bacterianas sob microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5600 LV) [47].

Análise estatística

O percentual hemolítico e a formação de biofilme de *A. baumannii* foram determinados por regressão linear usando o programa SPSS 18.0 (IBM Co., New York, USA). A análise de significância da inibição e erradicação do biofilme foi descrita por teste ANOVA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos naturais são considerados uma fonte para o desenvolvimento de novas drogas naturais ou sintéticas, e seu uso para fins terapêuticos é bastante antigo [20, 42, 67]. A credibilidade da fonte derivada acentua a ocorrência de inexistência ou restrição de produtos naturais com ação antimicrobiana [20, 62]; no entanto, a identificação recorrente de bactérias MDR envolvidas em IRAS é uma das principais razões para reinvestigar produtos naturais com ação antimicrobiana, visto o prazo relativamente limitado dos antimicrobianos [43].

Sabe-se que as IRAS continuam sendo uma das principais preocupações globais de saúde com impacto significativo na morbimortalidade, qualidade de vida dos pacientes e alto custo nos sistemas de saúde em todo o mundo [4, 52, 65]. Neste estudo, foram analisados isolados clínicos de *A. baumannii* MDR, que é um patógeno oportunista associado às infecções relacionadas a cateteres e queimaduras [39]. Essa espécie bacteriana acumula diversos mecanismos de resistência, tornando-a uma espécie multidroga, extensiva ou pandroga-resistente, além da capacidade de desenvolver biofilme [26, 27, 36], que desempenha um papel importante na resistência antimicrobiana e virulência [19].

Diversos países têm utilizado produtos naturais como alternativa terapêutica para infecções [6, 25, 63]. É importante enfatizar que o uso de produtos à base de plantas está entre os agentes alternativos examinados para substituir os antimicrobianos convencionais e sintéticos [31, 34]; além disso, a atividade desses produtos é promissora, pois constituem mais de 75% de todos os antimicrobianos utilizados contra infecções bacterianas [23].

O uso de terapia combinada de antimicrobianos para o tratamento de infecções por *A. baumannii* é seguro [41, 57]; no entanto, alguns fatores como resistência antimicrobiana [29], antagonismo antimicrobiano [28] ou toxicidade antimicrobiana [7, 53, 55] podem comprometer a eficácia do tratamento. Por isso, é importante ressaltar que, principalmente, a monoterapia com fitomoléculas não deve ser utilizada, devido à alta CIM efetiva contra microrganismos, comparada aos antimicrobianos; por esta razão, os efeitos de combinações de antimicrobianos e fitomoléculas têm sido estudados.

Inicialmente, estudos com produtos naturais isolados ou em combinação devem analisar a citotoxicidade relacionada ao rompimento da membrana ou a capacidade de induzir a lise de eritrócitos [50]. Através desta análise, é possível determinar a potencial atividade terapêutica de compostos naturais [50]. Segundo Nofiani et al. [44], a ação hemolítica deve ser considerada alta quando for maior que 40% e baixa quando esse valor for menor que 10%. Yamaguchi & Veiga-Junior [68] observaram baixa atividade hemolítica (1,22 - 625 µg/mL) em óleos essenciais de *Endlicheria citriodorapela* (Lauraceae). Neste estudo, a ação hemolítica da riparina III sozinha e em combinação com a colistina foi avaliada em concentração sinérgica. Isoladamente, a riparina III apresentou baixo percentual hemolítico (9,35%; DP 1,06) e a colistina (1,85%; DP 1,20). Em relação à combinação sinérgica entre riparina III/colistina (25 µg/mL / 1 µg/mL) para *A. baumannii* (isolado 54) e riparina III/colistina (50 µg/mL / 0,25 µg/mL) para *A. baumannii* (isolado 808), ambos apresentaram percentual de 6,19% (DP 1,31) e 5,74% (DP 0,97), respectivamente; além disso, Oliveira et al. [46] confirmam que o composto natural que apresenta alta concentração citotóxica *in vitro*, não garante dados semelhantes *in vivo*.

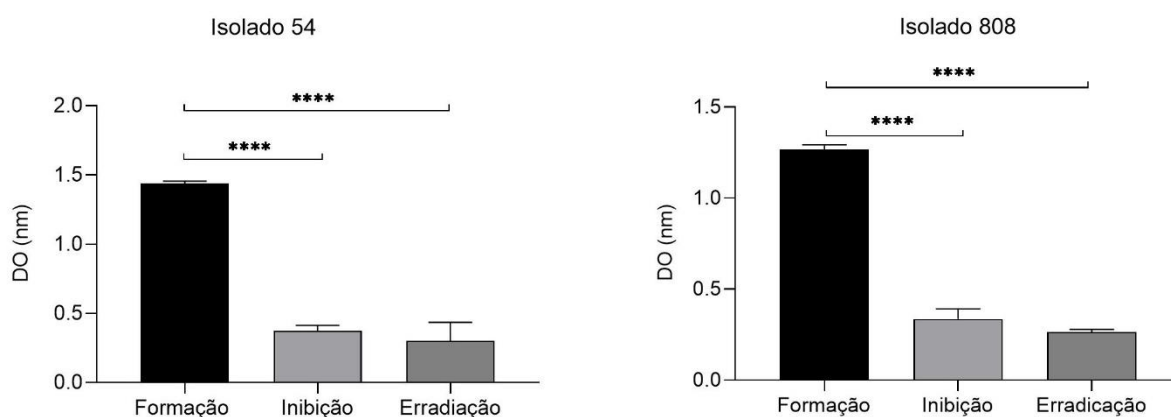
Em nossa análise, o baixo percentual hemolítico da combinação de riparina III/colistina sugere que não causa danos graves às membranas eritrocitárias. Assim, a estabilidade da membrana eritrocitária é uma referência para observar a ausência

de danos causados por compostos em triagens de citotoxicidade [58], bem como a capacidade de romper a membrana celular dos eritrócitos, por meio da análise de concentrações adequadas e tempos de incubação *in vitro* devem ser analisados [12].

Há identificação recorrente de *A. baumannii* resistente à colistina e formador de biofilme [24], sendo este um antimicrobiano de última linha para tratamento de *A. baumannii* MDR. Assim, o uso da combinação sinérgica entre antimicrobiano e produto natural está sendo contemplado como uma nova abordagem terapêutica alternativa [48].

Os isolados MDR de *A. baumannii* foram avaliados quanto à formação de biofilme *in vitro* através da análise das densidades ópticas dos isolados (DO_i) em comparação com as densidades ópticas dos controles (DO_c). Inicialmente, observou-se que ambos os isolados de *A. baumannii* (54 e 808) foram classificados como fortemente formadores de biofilme ($4 \times \text{DO}_c < \text{DO}_i$). Através da combinação sinérgica de riparina III/colistina (25 µg/mL / 1 µg/mL) para *A. baumannii* (isolado 54) e riparina III/colistina (50 µg/mL / 0,25 µg/mL) para *A. baumannii* (isolado 808), houve significativa inibição e erradicação do biofilme de *A. baumannii*, classificado posteriormente como formador de biofilme moderado e fraco (Figura 1).

Figura 1 - Formação, inibição e erradicação do biofilme de *Acinetobacter baumannii* (isolados 54 e 808) multidroga-resistentes submetidos à combinação de riparina III/colistina.



Legenda: A diferença entre as médias foi analisada pelo teste ANOVA. Os valores **** diferem significativamente entre as condições experimentais ($p < 0,0001$). DO (nm), Densidade óptica (nanômetros).

Diversos estudos confirmam que o uso de produtos naturais em combinação com antimicrobianos convencionais pode alterar o perfil de sensibilidade e diminuir a dose necessária para a eficácia terapêutica, além de exibir ação antibiofilme [5, 32, 45, 48, 56].

Maipomicina A (MaiA), que é isolada dos metabólitos de uma cepa rara de actinomiceto *Kibdelosporangium phytohabitans* XY-R10, foi analisada. Os autores observaram que MaiA tem efeito sinérgico para aumentar a eficácia da colistina contra *A. baumannii*, indicando que MaiA pode potencialmente servir como um agente antibiofilme eficaz para prevenir a formação de biofilme Gram-negativo [70]. A crisina, um componente do mel com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, foi avaliada a atividade antimicrobiana da combinação crisina/colistina contra *A. baumannii* tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os resultados revelaram que a combinação de crisina/colistina demonstrou um efeito inibitório na formação de biofilme [71].

Um estudo anterior observou que a riparina III tem ação contra o biofilme de *S. aureus*; no entanto, induziu a formação de biofilme de *A. baumannii* [47]. Porém, nosso estudo confirma que a combinação riparina III/colistina pode potencializar a atividade erradicante, bem como inibir a formação do biofilme de *A. baumannii* MDR, inferindo que esta combinação pode impedir a aderência do biofilme à superfície ou promover a destruição do biofilme formado.

Outro papel muito importante é a combinação de produto natural e antimicrobiano, como a colistina, que pode causar alterações ultraestruturais. Cushnie, O'Driscoll e Lamb [21] realizaram uma revisão abrangente sobre as principais alterações morfológicas observadas em células bacterianas induzidas por antissépticos, desinfetantes e drogas antibacterianas. Segundo os autores, entre as principais alterações estão: esferoplasto (células que perderam a camada de peptidoglicano), células ovoides, filamentação, bactéria pseudomulticelular (célula com múltiplos septos) ou ruptura septal, tamanho celular alterado, formação de protuberâncias, saliências, espessamento do peptidoglicano, separação das camadas do envelope celular, vacúolos intracelulares, entre outros. Nossos resultados corroboram esses dados.

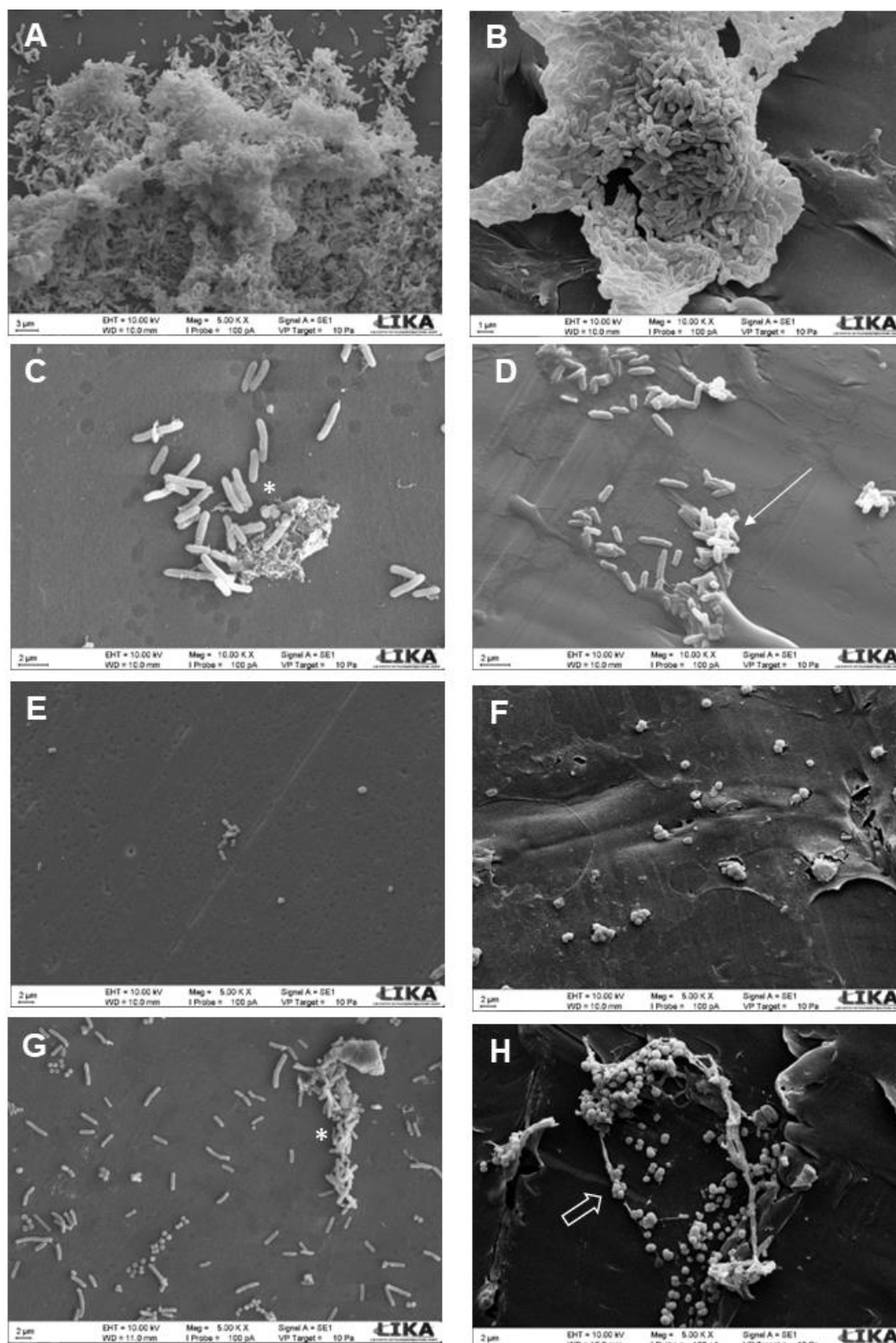
A MEV de *A. baumannii* (isolado 54) demonstrou células-controle com superfície intacta, morfologia de cocobacilo e aderidas à superfície com formação de biofilme. As células bacterianas submetidas à riparina III (25 µg/mL) apresentaram

células com alongamento e ausência de septo bacteriano, além de adesão celular com aparente formação de matriz extracelular. Quando submetida à colistina (1 µg/mL), houve redução no número de células bacterianas aderidas, bem como alteração morfológica. A exposição das células bacterianas à combinação de riparina III/ colistina (25 µg/mL / 1 µg/mL) provocou ausência do biofilme e presença de células alongadas e morfologia muito alterada - formato dos cocos, bem como destruição da matriz extracelular do biofilme, com algumas células vazando material citoplasmático (Figura 2).

Em relação à MEV de *A. baumannii* (isolado 808), as células-controle apresentaram formação de biofilme, no qual foi possível verificar a integridade da morfologia e superfície. As células expostas à riparina III (50 µg/mL) apresentaram morfologia de cocos aglomerados com ausência de matriz extracelular, e as células bacterianas expostas à colistina (0,25 µg/mL), houve redução no número de células bacterianas e alterações morfológicas, como células alongadas com uma superfície rugosa. Células bacterianas submetidas à combinação riparina III/colistina (50 µg/mL / 0,25 µg/mL) não foram capazes de formar o biofilme, sendo possível observar a alteração morfológica (células em forma de coco e alongadas), além da ausência de matriz extracelular (Figura 3).

Em outro estudo, os autores observaram que a associação riparina III/colistina promove alterações ultraestruturais em *A. baumannii*, como redução do número de células, aparência rugosa, além de morfologias indefinidas e desfragmentação total da parede celular bacteriana [48].

Figura 2 - Alterações ultraestruturais pela combinação riparina III/colistina contra biofilme de isolados clínicos multidroga-resistentes de *Acinetobacter baumannii* (isolado 54).

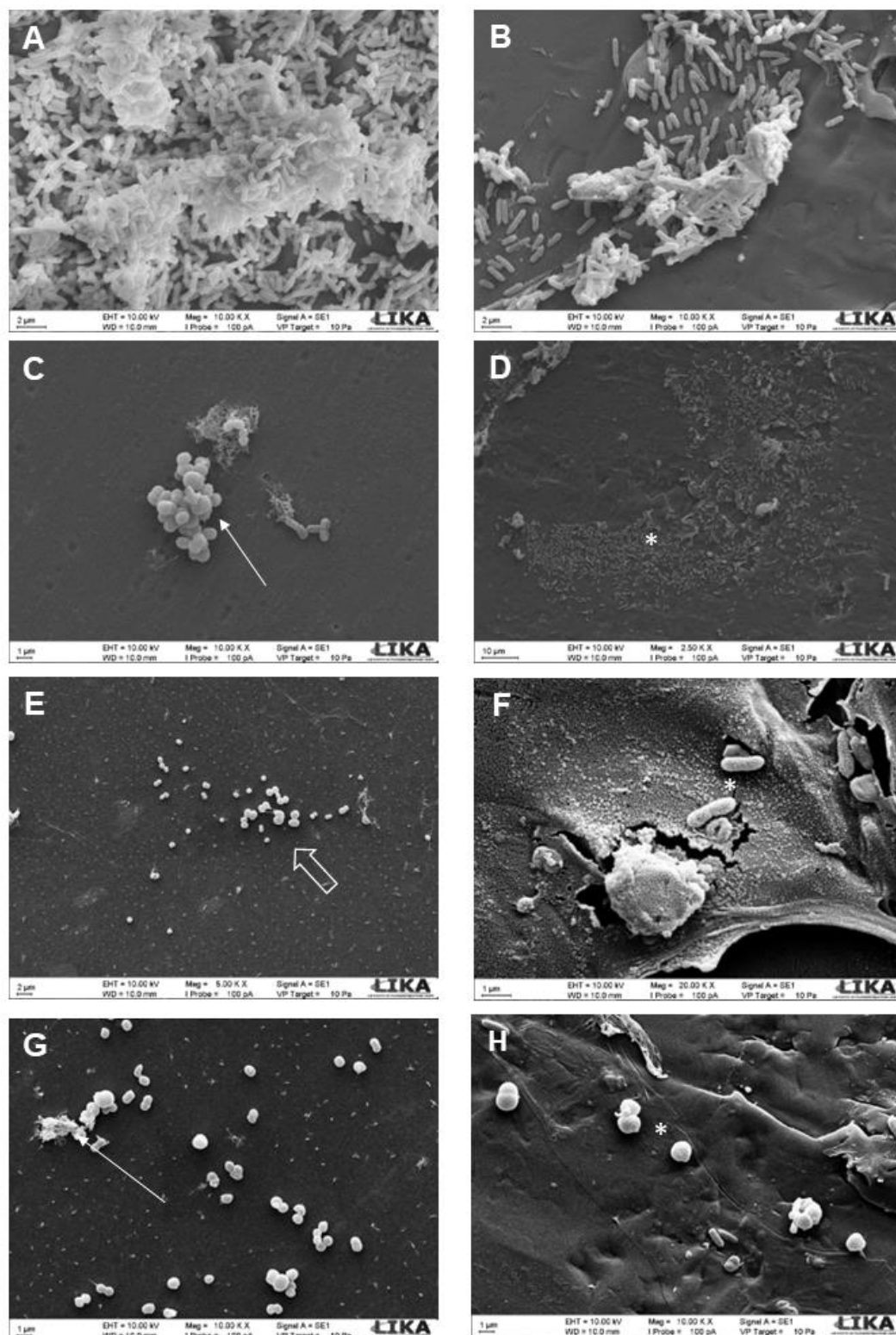


Micrografias eletrônicas de *Acinetobacter baumannii*, isolado 54. **A e B** - Células bacterianas (controle) mostrando superfície intacta e morfologia de cocobacilo. Observe aglomerados de células aderidas à

superfície do cateter com formação de biofilme. **C** e **D** - Células bacterianas submetidas à riparina III (25 µg/mL): observar alongamento celular sem a presença de septo bacteriano (asterisco) e adesão celular com aparente formação de matriz extracelular (seta). **E** e **F** - Células bacterianas expostas à colistina (1 µg/mL): observa-se redução do número de células bacterianas aderidas, apresentando alterações no tamanho e formato das células. **G** e **H** - Células bacterianas expostas à combinação riparina III/colistina (25 µg/mL / 1 µg/mL): observe ausência de biofilme e presença de células alongadas (asterisco) e bactérias de formato esférico (seta), além da destruição da matriz extracelular do biofilme, algumas células apresentam extravasamento de material citoplasmático.

Nossos dados corroboram estudos anteriores, visto que a combinação riparina III/colistina causou alterações ultraestruturais no biofilme de *A. baumannii* ou impediu sua formação na superfície do cateter. Este é o primeiro relato indicando que a combinação riparina III/colistina apresenta baixo percentual hemolítico e pode causar significativamente a inibição e erradicação do biofilme de *A. baumannii* MDR, além de demonstrar a capacidade de promover alterações ultraestruturais.

Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de isolados clínicos multidroga-resistentes de *Acinetobacter baumannii* (isolado 808) submetidos à combinação riparina III/colistina.



Micrografias eletrônicas de *Acinetobacter baumannii*, isolado 808. **A e B** - Células bacterianas (controle) mostrando formação de biofilme. Observe as células com morfologia e superfície intactas, formando

um aglomerado de células aderidas à superfície do cateter com produção de matriz extracelular. **C e D** - Células bacterianas expostas à riparina III (50 µg/mL): observar algumas células na forma de cocos aglomerados (seta longa) e células bacterianas aderidas à superfície do cateter sem a presença de matriz extracelular (asterisco). **E e F** - Células bacterianas expostas à colistina (0,25 µg/mL): observa-se redução do número de células bacterianas e mal aderidas, demonstrando alterações ultraestruturais no tamanho e forma celular, como células alongadas com superfície rugosa (asterisco). **G e H** - Células bacterianas submetidas à combinação riparina III/colistina (50 µg/mL / 0,25 µg/mL): observe ausência de biofilme e presença de bactérias de formato esférico (seta longa), algumas células alongadas (asterisco).

CONCLUSÃO

O efeito sinérgico deve permitir o uso de uma concentração mais baixa de um antimicrobiano para o tratamento de infecções. Isso foi determinado neste estudo através da associação da riparina III e colistina, exibindo baixo percentual hemolítico e ação inibitória e erradicatória sobre o biofilme de *A. baumannii* MDR, possibilitando promover diversas alterações ultraestruturais, como alongamento celular e destruição da matriz extracelular do biofilme.

Assim, pode-se inferir que a terapia combinada entre riparina III e colistina pode fornecer uma nova opção terapêutica para o controle de infecções envolvidas por *A. baumannii* MDR.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Dr. Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves pela análise das amostras bacterianas por Microscopia Eletrônica de Varredura. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Este trabalho foi desenvolvido no Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz/Pernambuco/Brasil) e no Instituto Keizo Asami (Universidade Federal de Pernambuco/Brasil).

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram nenhum conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. ALEKSIC, V.; KNEZEVIC, P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. **Review Microbiol Res** 169(4):240-254, 2014.
2. AL-KADMY, I. M. S. et al. Prevalence of genes involved in colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*: first report from Iraq. **Microb Drug Resist** 26(6):616-622, 2020.
3. ANBAZHAGAN D. et al. Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. **PLoS One**, 7(7): e36696, 2012.
4. ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infect Drug Resist** 11:1645-1658, 2018.
5. AYAZ, M., et al. Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: potential strategy to counteract drug resistance. **Chem Biol Interact** 308, 294-303. 2019.
6. BAKAL, S. N., BERESWILL, S., HEIMESAAT, M. M. Finding Novel Antibiotic Substances from Medicinal Plants - Antimicrobial Properties of *Nigella Sativa* Directed against Multidrug-resistant Bacteria. **Eur J Microbiol Immunol** 7(1): 92-98, 2017.
7. BALOCH, Z. Q. et al. Ciprofloxacin-induced hepatotoxicity in a healthy young adult. **Cureus** 9(2): e1016, 2017.
8. BANDEIRA JUNIOR, G. et al. Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria. **J Appl Microbiol** 125(3):655-665, 2018.
9. BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Benzoyl esters and amides, stryrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochem** 26(9):2615-2617, 1987.
10. BARBOSA, R. C. S. B. C. et al. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amaz**, 8(1/2):91-4, 1988. Suplemento.
11. BECERRA, M. C. et al. In vitro activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and trypomastigote forms. **Exp Parasitol** 131(1):57-62, 2012.

12. BUNEL, V. et al. Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: State of the art, strengths, and limits. **Planta Med** 80(14):1210-1226. 2014.
13. CAI, Y. et al. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms, and antimicrobial strategies. **J Antimicrob Chemother** 67(7):1607-1615. 2012.
14. CATÃO, R. M. R. et al. Evaluation of the antimicrobial activity about multiresistents samples of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Rev Bras An Clín**, 37(4):247-9, 2005.
15. _____. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras An Clín** 42(1):9-14, 2010.
16. CHEN, C. H. al. Clonal spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* across a community hospital and its affiliated long-term care facilities: a cross sectional study. **J Microbiol Immunol Infect** 51(3): 377-384. 2018.
17. CHOU, C. C. et al. Recommendations and guidelines for the treatment of pneumonia in Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect** 52(1):172-199, 2019.
18. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 29^a ed. CLSI suplemento M100. Wayne PA: Clinical & Laboratory Standards Institute, 2019.
19. COLQUHOUN, J. M.; RATHER, P. N. Insights into mechanisms of biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* and implications for uropathogenesis. **Front Cell Infect Microbiol** 10, 253. 2020.
20. COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev** 12:564-582, 1999.
21. CUSHNIE, T. P. T.; O'DRISCOLL, N. H.; LAMB, A. J. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. **Cell Mol Life Sci** 73(23):4471-4492, 2016.
22. DI DOMENICO, E. G. et al. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. **Int J Mol Sci**, 18:1077, 2017.
23. DURAND, G. A., RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods, and perspectives. **Int J Antimicrob Agents** 53, 371-382, 2019.

24. ELHAM, B.; FAWZIA, A. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from critically ill patients: clinical characteristics, antimicrobial susceptibility, and outcome. **Afr Health Sci** 19(3):2400-2406, 2019.
25. ELISHA, I. L. et al. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. **BMC Complement Altern Med** 17(1):133, 2017.
26. ERIKSSON, S. et al. Antibacterial and anti-biofilm effects of sodium hypochlorite against *Staphylococcus aureus* isolates derived from patients with atopic dermatitis. **Br J Dermatol** 177(2):513-521, 2017.
27. EZE, E. C.; CHENIA, H. Y.; EL ZOWALATY, M. E. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **Infect Drug Resist** 11:2277-2299, 2018.
28. FAM, N. et al. Antimicrobial efficacy of doripenem colistin combination on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates by E-test agar dilution and ultrastructural methods. **Egypt J Med Microbiol** 26(1): 1-7, 2017.
29. GALES, A. C. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). **Open Forum Infect Dis** 6(Suppl 1): S34-S46, 2019.
30. GISKE, C. G. et al. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. **Antimicrob Agents Chemother** 52(3): 813-821. 2008.
31. HARIKRISHNAN, R.; NISHA, R. M.; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquac** 221(1-4): 41-50, 2003.
32. HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A.K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Int. J. Phytomedicine**, 15, 639-652, 2008.
33. HSIEH, W. S.; WU, H. H. Types and Prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in Northern Taiwan. **Antimicrob Agents Chemother** 58, 201-204, 2014.

34. IMMANUEL, G. et al. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth, and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. **Aquac** 236 (1-4), 53-65, 2004.
35. KYRIAKIDIS, I. et al. A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. **Pathogens** 10(3):373, 2021.
36. MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. Antimicrobial resistance: *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clin Infect Dis** 46(8):1254-1263, 2008.
37. MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W. R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Med Chem** 5 (6), 517-528, 2009.
38. MEA, H. J.; YONG, P. V. C.; WONG, E. H. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence, and biofilm formation. **Microbiol Res** 247, 126722. 2021.
39. MULANI, M. S. et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Front Microbiol** 10:539, 2019.
40. NAGEEB, W. et al. In vitro antimicrobial synergy studies of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units of a tertiary care hospital in Egypt. **J Infect Public Health** 8(6):593-602, 2015.
41. NEWMAN, D. J. Predominately uncultured microbes as sources of bioactive agents. **Front Microbiol** 18(7):1832, 2016.
42. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod** 83(3):770-803, 2020.
43. NOFIANI, R.; KURNIADI, R.; ARDININGSIH, P. Antimicrobial, antioxidant, hemolytic activities, and toxicity of ethyl acetate extract from an unidentified coral associated fungus, *Aspergillus brevipes* RK06. **Indones J Cancer Chemoprevention** 2(2), 211-215, 2011.
44. OFOKANSI, K. C. et al. Evaluation of the combined antimicrobial activity of the leaf extract of *Phyllanthus muellerianus* with ciprofloxacin. **J Pharm Technol Drug Res** 2:16. 2013.
45. OLIVEIRA, J. F. et al. et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **Eur J Med Chem** 136: 305-314, 2017.

46. OLIVEIRA JÚNIOR, J. B. et al. Antimicrobial activity and biofilm inhibition of riparins I, II and III and ultrastructural changes in multidrug-resistant bacteria of medical importance. **Microb Pathog** 149: 104529, 2020.
47. _____. In vitro activity of riparin III in combination with antimicrobials against multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine Plus**, 100414, 2023.
48. OTTO, C. C. et al. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Ann Clin Microbiol Antimicrob** 9: 26, 2010.
49. PAILARD, F. et al. Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new entities. **Toxicol. in vitro** 13, 693-700, 1999.
50. PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Review Clin Microbiol Rev** 21(3):538-582. 2008.
51. PURO, V. et al. Pillars for prevention and control of healthcare-associated infections: an Italian expert opinion statement. **Antimicrob Resist Infect Control** 11(1):87, 2022.
52. ROBERTS, K. D. et al. Antimicrobial activity and toxicity of the major lipopeptide components of polymyxin b and colistin: last-line antibiotics against multidrug-resistant gram-negative bacteria. **ACS Infect Dis** 1(11):568-575, 2015.
53. RODRÍGUEZ-BANO, J. et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: Associated features and clinical implications. **Clin Microbiol Infect** 14(3):276-278, 2008.
54. RUTTER, W. C.; BURGESS, D. S. Incidence of acute kidney injury among patients treated with piperacillin-tazobactam or meropenem in combination with vancomycin. **Antimicrob Agents Chemother** 62(7). pii: e00264-18. 2018.
55. SABO, V. A. et al. Anti-*Acinetobacter baumannii* activity of selected phytochemicals alone, in binary combinations and in combinations with conventional antibiotics. **Nat Prod Res** 35(24):5964-5967, 2020.
56. SERTCELIK, A. et al. Synergistic activities of colistin combinations with meropenem, sulbactam, minocycline, disodium fosfomycin, or vancomycin against

- different clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. **Microb Drug Resist** 26(5):429-433, 2020.
57. SHARMA, P.; SHARMA, J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **J Ethnopharmacol** 74(3): 239-243, 2001
 58. SNYMAN, Y. et al. Clonal expansion of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Cape Town, South Africa. **Int J Infect Dis** 91:94-100, 2020.
 59. SPELLBERG, B.; REX, J. H. The value of single-pathogen antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov** 12(12):963, 2013.
 60. STEPANOVIĆ, S. et al. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**, 40(2): 175-179, 2000.
 61. SUBRAMANI, R.; NARAYANASAMY, M.; FEUSSNER, K. D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. **3 Biotech** 7(3):172, 2017.
 62. van VUUREN, S.; HOLL, D. Antimicrobial natural product research: a review from a South African perspective for the years 2009-2016. **J Ethnopharmacol** 17(208):236-252, 2017.
 63. WHO, World Health Organization. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report. Geneva: WHO; 2021. Available in: <https://www.amr-insights.eu/global-antimicrobial-resistance-and-use-surveillance-system-glass-report-2021/>. Access in: 25 fev 2022.
 64. WHO, World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. Available in: <https://www.aidsdatahub.org/sites/default/files/resource/who-global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria.pdf> Access in: 25 fev. 2020.
 65. WHO, World Health Organization. Programme on Traditional Medicine. (1998). **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review**. Geneva: WHO; 1998. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63801> Access in: 25 mar. 2020.
 66. YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma Lauraceae rica em geranato de metila. **Quim Nova** 36(6): 826-830, 2013.
 67. YOUNG, L. S.; SABEL, A. L.; PRICE, C. S. Epidemiologic, clinical, and economic evaluation of an outbreak of clonal multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*

- infection in a surgical intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol** 28(11):1247-1254. 2007.
- 68.ZHANG, J. et al. Maipomycin A, a novel natural compound with promising anti-biofilm activity against Gram-negative pathogenic bacteria. **Front. Microbiol** 11:598024, 2021.
- 69.ZHAO, Y. et al. In vitro and in vivo synergistic effect of chrysin in combination with colistin against *Acinetobacter baumannii*. **Front Microbiol** 13:961498, 2022.
- 70.ZHENG, J. Y. et al. Colistin for pneumonia involving multidrug-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **J Microbiol, Immunol Infect** 53(6):854-865, 2020.
- 71.ZHU, Y.; HUANG, W. E.; YANG, Q. Clinical Perspective of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **Infect Drug Resist** 15:735-746, 2022.
- 72.ZILBERBERG, M. D. et al. Multidrug-resistance, inappropriate empiric therapy, and hospital mortality in *Acinetobacter baumannii* pneumonia and sepsis. **Critical Care** 20(1): 221. 2016.

6 CONCLUSÃO

A identificação recorrente de espécies bacterianas MDR, como *S. aureus* e *A. baumannii*, envolvidas em infecções persistentes em pacientes internados em ambientes hospitalares, dificulta as opções terapêuticas, devido aos mecanismos de resistência e alto potencial de virulência, como a formação de biofilme. Isso tem impacto negativo na incidência de IRAS, visto a disseminação bacteriana rápida e ao desenvolvendo de surtos hospitalares, promovendo elevados índices de mortalidade de pacientes graves, especialmente internados em UTI.

Vale ressaltar que alguns produtos naturais de origem vegetal, quando utilizados isoladamente, podem exibir pouca eficácia contra isolados bacterianos MDR, limitado por seu espectro ou pelas altas concentrações comparadas aos antimicrobianos; contudo, o uso de produtos naturais em combinação com antimicrobianos disponíveis vem ganhando bastante relevância, sendo possível alterar os padrões de resistência aos antimicrobianos e a dose ideal com eficácia terapêutica.

Aqui, foi verificado que a associação entre a riparina III e colistina possui ótima interação sinérgica contra isolados clínicos de *A. baumannii* MDR, com diminuição bastante acentuada da concentração ideal da colistina. Além disso, foi observado um baixo percentual hemolítico e diversas alterações ultraestruturais. Por fim, foi possível determinar que a combinação sinérgica (riparina III/colistina) pode provocar a inibição e erradicação do biofilme de *A. baumannii*.

Assim, estes dados reafirmam o desenvolvimento de uma nova alternativa terapêutica *in vitro* utilizando a combinação entre riparina III e colistina, à qual se mostrou bastante promissora contra *A. baumannii* MDR, fornecendo um delineamento eficaz diante de infecções envolvendo essa espécie bacteriana; contudo, é necessária a realização de estudos de interação entre riparina III e colistina, bem como a determinação de sua toxicidade *in vivo* para assegurar a concentração sinérgica ideal contra microrganismos patogênicos, afim de inferir no aprimoramento de novas opções terapêuticas de IRAS.

REFERÊNCIAS

- AHMED, I. et al. Analysis of colony phase variation switch in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **PLoS One**; 14(1): e0210082, 2019.
- ALFEKY, A. A. E. et al. High Prevalence of multi-drug resistant Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in tertiary Egyptian hospitals. **J Infect Dev Ctries**; 16(5):795-806, 2022.
- AL-KADMY, I. M. S. et al. Molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* isolated from Iraqi hospital environment. **New Microbes New Infect**; 21:51-57, 2018.
- AL-KADMY, I. M. S. et al. Prevalence of genes involved in colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*: first report from Iraq. **Microb Drug Resist**; 26(6):616-622, 2020.
- ALLAWI, M. Y. Studying the synergistic effect of both propolis extract and green apple peel extract with fluconazole against *Candida albicans*. **Rafidain J Sci**; 28(1):7-12, 2019.
- AL-TAMIMI, M. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Jordan. **Microorganisms**; 10(5):849, 2022.
- ALVARADO-GOMEZ, E. et al. Adhesion forces of biofilms developed in vitro from clinical strains of skin wounds. **Mater Sci Eng**; 82:336-344, 2018.
- ALVES, R. C. C. et al. Antimicrobial activity of seaweeds of Pernambuco, northeastern coast of Brazil. **Afr J Microbiol Res**; 10(10):312-318, 2016.
- ANBAZHAGAN, D. et al. Detection of *quorum sensing* signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. **PLoS One**; 7(7):e36696, 2012.

ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol**; 39(2):119-128, 1993.

ANIBA. *Aniba riparia* (Nees) Mez. em Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro/RJ. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB84247>. Acesso em: 21 nov. 2021.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2021 a 2025**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Brasília: Anvisa, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/pnpciras_2021_2025.pdf. Acesso em: 20 fev. 2022.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. Módulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Brasília: Anvisa, 2020. 160p.: il.10 volume. Brasília: ANVISA; 2013. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-10_manual-de-microbiologia.pdf . Acesso em 29 dez. 2020.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório: Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e resistência microbiana (RM) em serviço da saúde**. UF: Pernambuco; Período: janeiro de 2012 a dezembro de 2021. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Brasília: Anvisa, 2022. 33p. Brasília: ANVISA; 2013. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/servicosdesaude/prevencao-e-controle-de-infeccao-e-resistencia-microbiana/copy_of_infeccao-relacionada-a-assistencia-a-saude/pernambuco Acesso em 20 jan. 2022.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde** - série segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Brasília: Anvisa, 2021. 103p. Versão a ser diagramada posteriormente. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/manual-prevencao-de-multirresistentes7.pdf> Acesso em 20 jan. 2022.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes** Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Brasília: Anvisa, 2010. 9p. Disponível em: <https://www.saude.sc.gov.br/index.php/documentos/informacoes-gerais/vigilancia-em-saude/ceciss/legislacao-federal-ceciss/4078-nota-tecnica-n-1-2010/file> Acesso em 20 jan. 2022.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteção do gene responsável pela resistência à polimixina mediada por plasmídeos (mcr1) no Brasil**. Comunicado de risco nº. 01/2016 - GVIMS/ GGTES/ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Brasília: Anvisa, 2013. 14p. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco/comunicado-de-risco-n-01-2016-gvims-ggtes-anvisa.pdf/view> Acesso em 20 jan. 2022.

ANYANWU, M. U.; OKOYE, R. C. Antimicrobial activity of Nigerian medicinal plants. **J Intercult Ethnopharmacol**; 6(2):240-259, 2017.

APG III. An update of the *Angiosperm* phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Bot J Linn**; 161:105-121, 2009.

ARAÚJO, I. A. **Beilschmiedia Nees (Lauraceae) do Estado do Rio de Janeiro**. 1994. 59f. Dissertação. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1994.

ARSHIA, et al. Antibiofilm potential of synthetic 2-amino-5-chlorobenzophenone Schiff bases and its confirmation through fluorescence microscopy. **Microb Pathog**; 110:497-506, 2017.

ARROYO, L. A. et al. The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. **Antimicrob Agents Chemother**; 55(8):3743-3751, 2011.

ARRUDA, T. A. et al. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Rev Bras Farmacogn**; 16(3):307-311, 2006.

ASIF, M.; ALVI, I. A.; REHMAN, S. U. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. **Infect Drug Resist**; 11:1249-1260, 2018.

ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infect Drug Resist**; 11:1645-1658, 2018.

ATIF, M. et al. Investigation of antimicrobial use at a tertiary care hospital in Southern Punjab, Pakistan using WHO methodology. **Antimicrob Resist Infect Control**; 6(1):41, 2017.

AZEVEDO, F. K. S. F. et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in two hospitals in Central Brazil: the role of ST730 and ST162 in clinical outcomes. **J Med Microbiol**; 68(1):31-40, 2019.

BAITELLO, J. B. Novas espécies de Lauraceae para a Flora Brasileira. **Acta Bot Brasilica**; 15(3):445-450, 2001.

BAKAL, S. N.; BERESWILL, S.; HEIMESAAT, M. M. Finding novel antibiotic substances from medicinal plants - antimicrobial properties of *Nigella sativa* directed against multidrug-resistant bacteria. **Eur J Microb Immunol**; 7(1):92-98, 2017.

BALKHAIR, A. et al. Prevalence and 30-day all-cause mortality of carbapenem-and colistin-resistant bacteraemia caused by *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*: description of a decade-long trend. **Int J Infect Dis**; 85:10-15, 2019.

BALOGH, Z. Q. et al. Ciprofloxacin-induced hepatotoxicity in a healthy young adult. **Cureus**; 9(2):e1016, 2017.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **J Pharm Anal**; 6:71-79, 2016.

BARBIERI, R. et al. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiol Res**; 196:44-68, 2017.

BARBOSA, T. D. M.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. A família Lauraceae Juss. no município de Santa Teresa, Espírito Santo. **Bol Mus Biol Mello Leitão (N. Sér.)**; 30:5-178, 2012.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochem**; 26(9):2615-2617, 1987.

BARBOSA-FILHO, J. M., YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O. R. The tyramines of transformation into models of natural products. **Rev Latinoam Quím**; 21:5-7, 1990.

BARBOSA, R. C. S. B. C. et al. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amaz**; 8(1/2):91-94, 1988. Suplemento.

BARDBARI, A. M. et al. Highly synergistic activity of melittin with imipenem and colistin in biofilm inhibition against multidrug-resistant strong biofilm producer strains of *Acinetobacter baumannii*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**; 37(3):443-54, 2018.

BATISTA, O. M. et al. Cateter urinário: o tempo de exposição e calibre podem influenciar na formação de biofilme? **Acta Paul Enferm**; 31(5):535-541, 2018.

BECERRA, M. C. et al. *In vitro* activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and trypomastigote forms. **Exp Parasitol**; 131(1):57-62, 2012.

BESSA, C. M. A. S. et al. *Syagrus coronata* seed oils have antimicrobial action against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Med Plants Res**; 10(23):310-317, 2016.

BIGOT, S.; SALCEDO, S. P. The influence of two-partner secretion systems on the virulence of *Acinetobacter baumannii*. **Virulence**; 8:6, 653-654, 2017.

BIOWEB. *Aniba riparia*. Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Disponível em: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/UsoDatos/> Acesso em: 29 abr. 2021.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS**; 121(suppl.136):1-54, 2013.

BOCCOLINI, M. M; BOCCOLINI, S. Prevalence of complementary and alternative medicine (CAM) use in Brazil. **BMC Complement Med**; 20(1):51, 2020.

BOSE, P. K. On some biochemical properties of natural coumarins. **J Indian Chem Soc**; 58:367-375, 1958.

BOUYAHYA, A. et al. Mechanisms, anti-*quorum-sensing* actions, and clinical trials of medicinal plant bioactive compounds against bacteria: a comprehensive review. **Molecules**; 27(5):1484, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2616/MS/GM, de 12 de maio de 1998. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília (DF): Ministério da Saúde; 1998. Disponível em:

https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html

Acesso em: 25 jul. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica.** - Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 92 p. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf> Acesso em: 20 jul. 2020.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial da União. Brasília, DF, 18 de março de 2004b. Disponível em:

https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf

Acesso em: 20/07/2019.

BREILH, D. et al. Carbapenems. **J Chemother**; 25(1):1-17, 2013.

BREMMER, D. K. et al. Correlation of checkerboard synergy testing with time-kill analysis and clinical outcomes of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* respiratory infections. **Antimicrob Agents Chemother**, 60(11):6892-6895, 2016.

BUNEL, V. et al. Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: State of the art, strengths, and limits. **Planta Med**; 80(14):1210-1226, 2014.

CAI, Y. et al. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms, and antimicrobial strategies. **J Antimicrob Chemother**; 67(7):1607-1615, 2012.

CAMILO, C. J.; PEDER, L. D.; SILVA, C. M. Prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente em profissionais de enfermagem. **Rev Saúde Pesq**; 9(2):361-371, 2016.

CARDINAL, L. S. M. et al. Caracterização das prescrições medicamentosas em unidade de terapia intensiva adulto. **Rev Bras Ter Intensiva**; 24(2):151-156, 2012.

CASTELO-BRANCO, U. J. V. et al. Atividade espasmolítica de benzamidas isoladas de *Aniba riparia* (parte 1). **Resumo VI Annual Meeting of the Federation of the Societies of Experimental Biology, FESBE, Brazil**. Abstr. 6(69):302, 1991.

CASTELO-BRANCO, U. V. **Preparação e estudos farmacológicos do éter metílico de N-benzoiltiramina e do éter metílico de N-(2-hidroxibenzoil) tiramina**. Dissertação. (Mestrado). Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, 1992.

CASTELO-BRANCO, U. V. et al. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae). **Acta Farm Bonaerense**; 19(3):197-202, 2000.

CATÃO, R. M. R. et al. Evaluation of the antimicrobial activity about multiresistents samples of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Rev Bras An Clín**; 37(4):247-249, 2005.

CATAO, R. M. R. et al. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” do extrato etanólico de *Punica granatum* Linn. (romã) sobre cepas de isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras An Clín**; 38(2):111-114, 2006.

CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras An Clín**, 42(1):9-14, 2010.

CAVALCANTE, E. F. O. et al. Implementation of patient safety centers and the healthcare-associated infections. **Rev Gaucha Enferm**; 40(spe): e20180306, 2019.

CDC, Centre of Disease Control and Prevention, 2019. **Antibiotic Threats in the United States. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC**; 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-antibiotic-threats-report-508.pdf> Acesso em: 01 jan 2020.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2014. **Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus***, 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov.abcs/reports-findings/survreports/mrsa14.html> Acesso em: 01 jan 2020.

CECIH, Comissão Estadual de Controle de Infecção Hospitalar. **Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde e resistência microbiana do estado de Pernambuco** - primeiro semestre de 2016. Disponível em: <http://apevisa.saude.pe.gov.br/apevisa/upload/galeria/1266/Boletim%20n%C2%BA%201%20CECIH%20-%20out%202016.pdf>. Acesso em 20 nov 2018.

CHANDERBALI, A. Lauraceae: Endlicheria. **Fl Neotrop Monogr**; 91:1-141, 2004.

CHANDERBALI, A.; van der WERFF, H.; RENNER, S. Phylogeny, and historical biogeography of Lauraceae: Evidence from the chloroplast and nuclear genomes. **Ann Mo Bot Gard**; 88:104-134, 2001.

CHEN, C. H. et al. Clonal spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* across a community hospital and its affiliated long-term care facilities: a cross sectional study. **J Microbiol Immunol Infect**; 51(3):377-384. 2018.

CHEN, Y. et al. Clinical characteristics, risk factors, immune status, and prognosis of secondary infection of sepsis: a retrospective observational study. **BMC Anesthesiol**; 19(1):185, 2019.

CHOU, C. C. et al. Recommendations and guidelines for the treatment of pneumonia in Taiwan. **J Microbiol, Immunol Infect**; 52(1):172-199, 2019.

CLSI, Clinical & Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical & Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2019.

CICHEWICZ, R. H.; THORPE, P. A. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. **J Ethnopharmacol**; 52:61-70, 1996.

CIOFU, O. et al. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. **Adv Drug Deliv Rev**; 85:7-23, 2015.

COATES, R.; MORAN, J.; HORSBURGH, M. J. Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. **Future Microbiol**; 9:75-91, 2014.

CORDELL, G. A.; QUIRN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytother Res**; 15:183-205, 2001.

CORREA, M. S. et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil from dried leaves of *Eucalyptus staigeriana*. **Arq Inst Biol**; 86:1-8, e0202018, 2019.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Ann Rev Microbiol**, 41:435-464, 1987.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **Int J Antimicrob Agents**; 11(3-4):217-21/237-9, 1999.

COUTINHO, H. D. M. et al. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Rev Conceitos**; 77:77-85, 2004.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev**; 12:564-582, 1999.

CRESS, B. F. et al. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. **FEMS Microbiol Rev**; 38(4):660-697, 2014.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). *In*: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

DE CARVALHO, A. M. R. et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chem-Biol Interact**; 205(3):165-172, 2013.

DEHBALAEI, M. A. et al. Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from tehran hospitals: pulsed-field gel electrophoresis characterization, clonal lineages, antibiotic susceptibility, and biofilm-forming ability. **Jundishapur J Microbiol**; 10(7):e13790, 2017.

DE OLIVEIRA, D. M. P. et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clin Microbiol Rev**; 13;33(3):e00181-19, 2020.

de SÁ CAVALCANTI, F. L. et al. High frequency of OXA-253-producing *Acinetobacter baumannii* in different hospitals in Recife, Brazil: a new threat? **Antimicrob Agents Chemother**; 61(1), 2017.

DEWICK, P. M. Alkaloids. *In* Medicinal natural products: a biosynthetic approach, 3rd Edition, John Wiley & Sons Ltd.pp 311-417. 2009.

DI DOMENICO, E. G. et al. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. **Int J Mol Sci**; 18:1077, 2017.

DJORDJEVIC, Z. M.; FOLIC, M. M.; JANKOVIC, S. M. Distribution and antibiotic susceptibility of pathogens isolated from adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia in intensive care unit. **J Infect Public Health**; pii:S1876-0341(17)30028-X, 2017.

DOI, Y.; MURRAY, G. L.; PELEG, A. Y. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. **Semin Respir Crit Care Med**; 36(1):85-98, 2015.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg Infect Dis**; 7(2):277-281. 2001.

dos SANTOS, L. R. et al. Antimicrobial activity of essential oils and natural plant extracts against *Listeria monocytogenes* in a dry-cured ham-based model. **J Sci Food Agr**; 102(4):1729-1735, 2022.

dos SANTOS, S. G. et al. Blood matrix effects for male and female Wistar rats, in simultaneous HPLC-UV determination of riparin I and III from *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae). **Talanta**; 86(1):233-240, 2011.

DUARTE, M. C. T. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Rev Bras Farmacogn**; 14(Supl 1):6-8, 2004.

ELEMAM, A.; RAHIMIAN, J.; DOYMAZ, M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin b-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **J Clin Microbiol**; 48(10):3558-3562, 2010.

ELLER, S. C. W. S. et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**; 36(1):131-136, 2015.

ELISHA, I. L. et al. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. **BMC Complement Altern Med**; 17(1):133, 2017.

ELJAALY, K.; ALSHEHRI, S.; ERSTAD, B. L. Systematic review and meta-analysis of the safety of antistaphylococcal penicillins compared to cefazolin. **Antimicrob Agents Chemother**; 62(4):e01816-17, 2018.

ERIKSSON, S. et al. Antibacterial and anti-biofilm effects of sodium hypochlorite against *Staphylococcus aureus* isolates derived from patients with atopic dermatitis. **Br J Dermatol**; 177(2):513-521, 2017.

ERDEM, I. et al. A 5-year surveillance of healthcare-associated infections in a university hospital: a retrospective analysis. **SAGE Open Med**; 10:20503121221091789, 2022.

FAM, N. et al. Antimicrobial efficacy of doripenem colistin combination on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates by E-test agar dilution and ultrastructural methods. **Egypt J Med Microbiol**; 26(1):1-7, 2017.

FAROOQUI, A. et al. Synergistic antimicrobial activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against multidrug-resistant bacteria. **PLoS One**; 10:e0118431, 2015.

FERNANDES, J. B.; GOTTHEB, O. R.; XAVIER, L. M. Chemosystematic implications of flavonoids in *Aniba riparia*. **Biochemical Systematic and Ecology**; 6:55p. 1978.

FERRANDIZ-PULIDO, C.; GARCIA-PATOS, V. A review of causes of Stevens Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in children. **Arch Dis Child**; 98:998-1003, 2013.

FERREIRA, E. G. et al. Prevalence of ventilator-associated pneumonia through analysis of tracheobronchial secretions. **Rev Rene**; 18(1):114-120, 2017.

FLEMMING, H. C.; WUERTZ, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. **Nat Rev Microbiol**; 17(4):247-260, 2019.

FRANÇA, N. C. et al. Tri-o-methylgalangin from *Aniba riparia*. **Phytochem**; 15:572-573, 1976.

FRANK, U. et al. Cost-effectiveness of an antiseptic-impregnated central venous catheter in the ICU. **Intensive Care Med**; 29(1):139, 2003.

FRASER, J. L. et al. Healthcare-associated outbreaks of bacterial infections in Africa, 2009-2018: A review. **Int J Infect Dis**; 103:469-477, 2021.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **J Infect Public Health**; 10:369-378, 2017.

FUJIKURA, Y. et al. Blood stream infections caused by *Acinetobacter baumannii* group in Japan e epidemiological and clinical investigation. **J Infect Chemother**; 22(6):366-371, 2016.

GALES, A. C. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). **Open Forum Infect Dis**; 6(Suppl 1):S34-S46, 2019.

GARCEZ, F. R. et al. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Quim Nova**; 32(2):407-411, 2009.

GBIF, Global Biodiversity Information Facility. Backbone Taxonomy *Aniba riparia* (Nees) Mez. (2021). *Checklist dataset*. Disponível: <https://doi.org/10.15468/39omei>. Acesso em: 07 Mar. 2021.

GHEDA, S. F.; ISMAIL, G. A. Natural products from some soil cyanobacterial extracts with potent antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities. **An Acad Bras Ciênc**; 92(2):e20190934, 2020.

GHOSHAL, S.; KRISHNA PRASAD, B. N.; LAKSHMI, V. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* *in vitro* and *in vivo*. **J Ethnopharmacol**; 50:167-170, 1996.

GISKE, C. G. et al. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. **Antimicrob Agents Chemother**; 52(3):813-821, 2008.

GLEW, R. H.; MOELLERING, R. C. J.; KUNZ, E. L. J. Infections with *Acinetobacter calcoaceticus* (*Herellea vaginicola*): clinical and laboratory studies. **Medicine (Baltimore)**; 56:79-97, 1977.

GOULART, M. E. A. et al. *Staphylococcus aureus* isolado de swab nasal em um hospital militar. **Rev Saúde**; 06(1):05-28, 2015.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Fatores que afetam a cicatrização de feridas. **J Dental Res**; 89:219-229, 2010.

GUO, Y. et al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. **Front Cell Infect Microbiol**; 10(107):1-11, 2020.

HAEILI, M.; KAFSHDOUZ, M.; FEIZABADI, M. M. Molecular mechanisms of colistin resistance among pandrug-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* with high case-fatality rate in intensive care unit patients. **Microb Drug Resist**; 24(9):1271-1276, 2018.

HAIDAR, G. Identifying spectra of activity and therapeutic niches for ceftazidime-avibactam and imipenem-relebactam against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**; 61(9):e00642-17, 2017.

HAMBURGER, H.; HOSTETTMANN, K. The link between phytochemistry and medicine. **Phytochem**; 30:3864-3874, 1991.

HAMAM, S. S. et al. Health care-associated infections at an Egyptian tertiary care hospital: a 2-year prospective study. **Menoufia Med J**; 34:514-520, 2021.

HELFAND, M.; CRAPO, L. M. Monitoring therapy in patients taking levothyroxine. **Ann Intern Med**; 13(6):450-454, 1990.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale*. **J Agric Food Chem**; 39:418-421, 1991.

HSIEH, W. S. et al. Types and prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in Northern Taiwan. **Antimicrob Agents Chemother**; 58:201e4, 2014.

HOFER, O. et al. ¹³C NMR and ¹H lanthanide induced shifts of naturally occurring alkalamides with cyclic amide moieties: amides from *Achillea falcata*. **Tetrahedron Lett**; 42:2707-2716; 1986.

HØIBY, N. et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clin Microbiol Infect**; 21:S1-S25, 2015.

HOWDEN, B. P. et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clin Microbiol Rev**; 23:99-139, 2010.

IBRAHIM, S. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. **Mol Biol Rep**; 48:6987-6998, 2021.

INCHAI, J. et al. Prognostic factors associated with mortality of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. **J Intensive Care**; 3:9, 2015.

JADIMURTHY, R. et al. Escaping mechanisms of ESKAPE pathogens from antibiotics and their targeting by natural compounds. **Biotechnol Rep**; 34:e00728, 2022.

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **J Chin Med Assoc**; 81(1):7-11, 2018.

JOHNSTON, W. et al. Mechanical biofilm disruption causes microbial and immunological shifts in periodontitis patients. **Sci Rep**; 11(1):9796, 2021.

KHAN, I. A. et al. Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**; 50(2):810-812, 2006.

KANODIA, P. et al. Bacteriological profile of blood culture positive sepsis in newborn at BPKIHS, Dharan Nepal. **J Coll Med Sci Nepal**; 13(1), 2017.

KARLOWSKY, J. A. et al. *In vitro* activity of aztreonam-avibactam against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolated by clinical laboratories in 40 countries from 2012 to 2015. **Antimicrob Agents Chemother**; 61(9):e00472-17, 2017.

KATIYAR, R. et al. High prevalence of multiple drug-resistant and biofilm forming *Staphylococcus aureus* among infected patients with suspected pneumonia. **J Pure Appl Microbiol**; 12(4):1905-1912, 2018.

KAYE, K. S.; GALES, A. C.; DUBOURG, G. Old antibiotics for multidrug-resistant pathogens: from in vitro activity to clinical outcomes. **Inter J Antimicrob Agents**, 49(5):542-548, 2017.

KHALIL, M. A. F. et al. Virulence characteristics of biofilm-forming *Acinetobacter baumannii* in clinical isolates using a *Galleria mellonella* model. **Microorganisms**; 9(11):2365, 2021.

KLEIN, R. M.; REIS, A.; REITZ, R. Madeiras do Brasil. Ed. Lunardelli, Florianópolis, 320p., il. 1979.

KONTOPOULOU, K, et al. Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. **J Hosp Infect**; 76(1):70-73, 2010.

KOSTERMANS, A. J. G. H. A historical survey of Lauraceae. **J Sci Res Indonesia**; 1:83-95, 113-127, 141-159, 1952.

KUBITZKI, K.; RENNER, S. Lauraceae I (*Aniba* and *Aiouea*). **Fl Neotropica**; 31:1-124, 1982.

LAHMAR, A. et al. Reversal of resistance in bacteria underlies synergistic effect of essential oils with conventional antibiotics. **Microb Pathog**, 106:50-59, 2017.

LEE A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nat Rev Dis Primer**; 4:18033, 2018.

LEE, C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Front Cell Infect Microbiol**; 7:55, 2017.

LEE, J. et al. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **J Clin Microbiol**; 47(5):1611-1612, 2009.

LEE, N. Y. et al. Empirical antimicrobial therapy for critically ill patients with *Acinetobacter baumannii* bacteremia: combination is better. **J Microbiol Immunol Infect**; 46(5):397-398, 2013.

LEE, Y. W. et al. Complete genome of the multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain KBN10P02143 isolated from Korea. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; 111(5):355-358, 2016.

LEITE, G. C. et al. Effect of antibiotics combination and comparison of methods for detection of synergism in multiresistant Gram-negative bacteria. **J Infect Dis Ther**; 3(2):207, 2015.

LI, Z. et al. Pathogenic characteristics and risk factors for ESKAPE pathogens infection in burn patients. **Infect Drug Resist**; 14:4727-4738. 2021.

LIN, M. F.; LAN, C. Y Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside. **World J Clin Cases**; 2:787-814, 2014.

LIN, Y. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by strategies targeting the metabolism of exopolysaccharides. **Crit Rev Microbiol**; 47(5):667-677, 2021.

LIH, B. et al. Correlation analysis between chronic osteomyelitis and bacterial biofilm. **Stem Cells Int**; 2022:9433847, 2022.

LIU, Y.; ZHANG, J.; JI, Y. Environmental factors modulate biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Sci Prog**; 103(1):36850419898659, 2020.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. Instituto Plantarum: Nova Odessa, São Paulo, 2 ed, p.85-89, 2008.

LOYOLA-CRUZ, M. A. et al. ESKAPE bacteria characterization reveals the presence of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in COVID-19/VAP patients. **Am J Infect Control**; S0196-6553(22)00625-3, 2022.

LUNA, M. S. M. et al. Chemical composition of *Libidibia ferrea* var. *ferrea* aqueous extract for antimicrobial purpose and cytogenotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. **S Afr J Bot**; 148:336-343, 2022.

MACEDO, N. S. et al. Phytochemical prospection, evaluation of antibacterial activity and toxicity of extracts of *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. **Arab J Chem**; 15(2):103632, 2022.

MACIEL, C. C. S.; CÂNDIDO, H. R. L. F. Infecção Hospitalar: principais agentes e drogas administradas. **Veredas Favip - Rev Eletrôn Ciênc**; 3(1), 2013.

MADRIÑAN, S. Lauraceae: Rhodostemonodaphne. **Fl Neotrop Monogr**; 92:1-102, 2004.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**; 18(3):268-281, 2012.

MAIFIAH, M. H. M. et al. Untargeted metabolomics analysis reveals key pathway responsible for the synergistic killing of colistin and doripenem combination against *Acinetobacter baumannii*. **Sci Rep**; 7(45527), 2017.

MAINDAD, D. G. et al. Treatment of hospital-acquired infections in patients with cirrhosis - new challenges. **Infect Drug Resist**; 15:1039-1048, 2022.

MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cell Mol Life Sci**; 67:3057-3071, 2010.

MALAFAIA, C. B. et al. Effects of Caatinga plant extracts in planktonic growth and biofilm formation in *Ralstonia solanacearum*. **Microb Ecol**; 75:555-561, 2018.

MANDAL, S.M. et al. Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization. **Front Pharmacol**; 5(5):1-12, 2014.

MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. Antimicrobial resistance: *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clin Infect Dis**; 46(8):1254-1263, 2008.

MARCHESE, A. et al. The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies, and bio-inspired anti-infective materials. **Biofouling**; 34(6):630-656, 2018.

MARMITT, D. J. et al. Medical plants with potential antifungal properties listed in the RENISUS inventory. **Rev Bras Pesq Saúde**, 17(3):151-162, 2015(a).

MARMITT, D. J. et al. Plantas com potencial antibacteriano da relação nacional de plantas medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde: revisão sistemática. **Rev Saúde Pública/SC**; 8(2):135-152, 2015(b).

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae. **Floresta e Ambient**; 8(1):195-206, 2001.

MARQUES, C. A.; AZEVEDO, A. A. Caracterização anatômica da folha de *Aniba firmula* (Nees & C. Mart.) Mez. (Lauraceae). **Rev Ciênc Farm Básica e Apl**; 32(2): 251-256, 2011.

MARQUES, P. B.; CARNEIRO, F M. C.; FERREIRA, A. P. Perfil bacteriano de cultura de ponta de cateter venoso central. **Rev Pan-Amaz Saude**; 2(1):53-58, 2011.

MARTÍNEZ, L. C, VADYVALOO V. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. **Front Cell Infect Microbiol**; 4(38):15, 2014.

MARTINEZ, M. J. et al. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol**; 52:171-174, 1996.

MEA, H. J. et al. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. **Microbiol Res**; 247:126722, 2021.

MELO, C. T. V. et al. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-benzoyl-tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae) in mice. **Biol Pharm Bull**; 29:451-454, 2006.

MELO, C. T. V. et al. 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. **Fundam Clin Pharmacol**; 27(1):104-12, 2013.

MIETHKE, M. et al. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. **Nat Rev Chem**; 5(10):726-749, 2021.

MINAMI, H. et al. Microbial production of plant benzyloquinoline alkaloids. **PNAS**; 105(21):7393-7398, 2008.

MINKIEWICZ-ZOCHNIAK, A. et al. Biofilm formation on dental implant biomaterials by *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with cystic fibrosis. **Materials**; 14(8):2030, 2021.

MORGAN, D. J. et al. Non-prescription antimicrobial use worldwide: A systematic review. **Lancet Infect Dis**; 11(9):692-701, 2011.

MORI, S. A. et al. Southern Bahian moist Forest. **Bot Rev**; 49(2):155-232, 1983.

MOUBARECK, C. A.; HALAT, D. H. Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. **Antibiotics (Basel)**; 9(3):119, 2020.

MULANI, M. S. et al. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. **Front Microbiol**; 10:539, 2019.

MUDALIANA, S. Antimicrobial activity of *Centella asiatica* and *Gigantochloa apus*. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**; 32(4):755-759, 2021.

NAGANAWA, R. et al. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. **Appl Environ Microbiol J**; 62:4238-4242, 1996.

NAKAMURA, H. M.; CALDEIRA, S. M.; AVILA, M. A. G. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: Uma abordagem retrospectiva. **Rev Sobec**; 18(3):49-58, 2013.

NASUTION, Y. et al. Antimicrobial activities of *Centella asiatica* leaf and root extracts on selected pathogenic micro-organisms. **J Med Sci**; 18(4):198-204, 2018.

NEWMAN, D. J. Predominately uncultured microbes as sources of bioactive agents. **Front Microbiol**; 18(7):1832, 2016.

NEWMAN, D. J. Screening and identification of novel biologically active natural compounds. **F1000Research**; 6:783, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod**; 83(3):770-803, 2020.

NIEDZIELSKI, A.; CHMIELIK, L. P.; STANKIEWICZ, T. The formation of biofilm and bacteriology in otitis media with effusion in children: a prospective cross-sectional study. **Int J Environ Res Public Health**; 18(7):3555, 2021.

NIH, National Institutes of Health. Research on microbial biofilms (PA-03-047). NIH, National Heart, Lung, and Blood Institute. 2002-12-20. 2002.

NODARI, C. S. et al. Genomic analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates belonging to major endemic clones in South America. **Front Microbiol**; 11:584603, 2020.

NOURBAKHS, F. et al. From plants to antimicrobials: Natural products against bacterial membranes. **Phytother Res**; 36(1):32-52, 2022.

OFEK, I.; GOLDHAR, J.; SHARON, N. Anti-*Escherichia coli* adhesin activity of cranberry and blueberry juices. **Adv Exp Med Biol**; 408:179-183, 1996.

OFOKANSI, K. C. et al. Evaluation of the combined antimicrobial activity of the leaf extract of *Phyllanthus muellerianus* with ciprofloxacin. **J Pharm Technol Drug Res**; 2:16, 2013.

OKOLI, R. I. et al. Phytochemical and antimicrobial properties of four herbs from Edo State, Nigeria. **Rep Opin**; 1:67-73, 2009.

OLIVEIRA, A. C.; PAULA, A. O. Decolonization of *Staphylococcus aureus* carriers: indications, advantages, and limitations. **Text Context Nursing**; 21(2):448-457, 2012.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**; 32(4b): 793-810, 2000.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Braz J Cardiovasc Surg**; 21(4):444-452, 2006.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. B. et al. Antimicrobial activity and biofilm inhibition of riparins I, II and III and ultrastructural changes in multidrug-resistant bacteria of medical importance. **Microb Pathog**; 149:104529, 2020.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. B. et al. In vitro activity of riparin III in combination with antimicrobials against multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*. **Phytomed Plus**; 3(1):100414, 2023.

OTTO, C. C. et al. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**; 9:26, 2010.

PAILARD, F. et al. Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new entities. **Toxicol in vitro**; 13(4-5):693-700, 1999.

PALOMINO, J. C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**; 46(8):2720-2722, 2002.

PASANEN, T. Rapid molecular characterization of *Acinetobacter baumannii* clones with rep-PCR and evaluation of carbapenemase genes by new multiplex PCR in Hospital District of Helsinki and Uusimaa. **PLoS One**; 9(1):e85854, 2014.

PATEL, T. K. et al. A systematic review of the drug-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Indian population. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**; 79:389-398, 2013.

PATTNAIK, D. et al. Multidrug resistant, extensively drug resistant and pan drug resistant Gram-negative bacteria at a tertiary care center in Bhubaneswar. **Int J Community Med Public Health**; 6(2):567-572, 2019.

PEETERS, P. et al. The impact of initial antibiotic treatment failure: real-world insights in patients with complicated, health care-associated intra-abdominal infection. **Infect Drug Resist**; 12:329-343, 2019.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin Microbiol Rev**; 21(3):538-582, 2008.

PILLAI, S. K.; MOELLERING, R. C.; ELIOPOULOS, G. M. Antimicrobial Combinations. *In*: Lorian, V., Ed., Antibiotics in Laboratory Medicine, 5th Edition, the Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia: 2005, pp. 365-440.

POUR, N. K. et al. Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. **FEMS Immunol Med Microbiol**; 62(3): 328-338, 2011.

PURO, V. et al. Pillars for prevention and control of healthcare-associated infections: an Italian expert opinion statement. **Antimicrob Resist Infect Control**; 11(1):87, 2022.

QADRI, H. et al. Natural products and their semi-synthetic derivatives against antimicrobial-resistant human pathogenic bacteria and fungi. **Saudi J Biol Sci**; 29(9):103376, 2022.

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Bot Brasilica**; 19(3):563-572, 2005.

QUINET, A. Nova espécie e novo nome em *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) para o Brasil. **Acta Bot Brasilica**; 24(1):225-228, 2010.

QUINET, A.; ANDREATA, R.H.P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**; 53(82):59-121, 2002.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. L. R. 2012. Lauraceae *In*: Forzza, R.C. et al. (eds.). **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB008440>. Acesso em 04 Jun. 2019.

RAMIREZ-BLANCO, C. E. et al. Infection in burn patients in a referral center in Colombia. **Burns**, 43(3):642-653, 2017.

RASMI, A. H. et al. Virulence genes distributed among *Staphylococcus aureus* causing wound infections and their correlation to antibiotic resistance. **BMC Infect Dis**; 22(1):652, 2022.

RELLO, J. et al. A global priority list of the TOP TEn resistant Microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**; 38(2):319-323, 2018.

RENNER, L. D. et al. Detection of ESKAPE bacterial pathogens at the point of care using isothermal DNA-based assays in a portable degas-actuated microfluidic diagnostic assay platform. **Appl Environ Microbiol**; 83(4):e02449-16, 2017.

RIZZINI, C. T. Árvores e madeiras úteis do Brasil. São Paulo: E. Blücher. 286 p. 1971.

ROBERTS, P. J. et al. Characteristics of 32 *Acinetobacter baumannii* isolates co-harboring OXA-carbapenemases and 16S rRNA methylase gene. **Afr J Microbiol Res**; 11(4):110-116, 2017.

ROCHA, D. A. M. et al. A analysis of the phytochemical composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of extracts from *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Apocynaceae). **Int J Herb Med**; 10(1):32-39, 2022.

ROCHA, I. V. et al. Resistência de bactérias isoladas em equipamentos em unidade de terapia intensiva. **Acta Paul Enferm**; 28(5):433-439, 2015.

RODRÍGUEZ-RUBIO, L. et al. The phage lytic proteins from the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB_SauS-philPLA88 display multiple active catalytic domains and do not trigger staphylococcal resistance. **PLoS One**; 8(5):e64671, 2013.

ROHWER, J. G. Lauraceae. In K. Kubitzki, J. G. Rohwer & V. Bittrich. The families and genera of vascular plants. Flowering plants. Dicotyledons. Volume 2. Springer-Verlag, Berlin, p. 366-391, 1993a.

ROHWER, J. G. Lauraceae: Nectandra. **Fl Neotrop Monogr**; 60:1-332, 1993b.

ROHWER, J. G. Toward a phylogenetic classification of the Lauraceae: Evidence from matK sequences. **Syst Bot**; 25(1):60-71, 2000.

ROHWER, J. G.; RUDOLPH, B. Jumping genera: The phylogenetic positions of *Cassytha*, *Hypodaphnis*, and *Neocinnamomum* (Lauraceae) based on different analyses of trnK intron sequences. **Ann Mo Bot Gard**; 92(2):153-178, 2005.

ROMÃO, A. R. et al. *Staphylococcus aureus* bacteremia in a Brazilian Midwest teaching hospital. **Rev Patol Trop**; 45(4):412-416, 2016.

ROSATO, A. et al. Elucidation of the synergistic action of *Mentha piperita* essential oil with common antimicrobials. **PLoS ONE**; 13(8):e0200902, 2018.

ROSSI, F. et al. Rates of antimicrobial resistance in Latin America (2004-2007) and in vitro activity of the glycylicycline tigecycline and of other antibiotics. **Braz J Infect Dis**; 12(5):405-415, 2008.

RUEKIT, S. et al. Molecular characterization of multidrug-resistant ESKAPEE pathogens from clinical samples in Chonburi, Thailand (2017-2018). **BMC Infect Dis**; 22(1): 695. 2022.

RUTTER, W. C.; BURGESS, D. S. Incidence of acute kidney injury among patients treated with piperacillin-tazobactam or meropenem in combination with vancomycin. **Antimicrob Agents Chemother**; 62(7):e00264-18, 2018.

RYBTKE, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. **J Mol Biol**; 427(23):3628-45, 2015.

SAHIN, A. Z. et al. Antimicrobial activity of natural compounds from *Kalanchoe crenata* against pathogenic bacteria. **Clin Microbiol Infect Dis**; 4:1-4, 2019.

SALEM, N. et al. Variation in chemical composition of *Eucalyptus globulus* essential oil under phenological stages and evidence synergism with antimicrobial standards. **Indus Crop Prod**; 124:115-125, 2018.

SALES, V. M. et al. Microbiological analysis of inanimate surfaces in an Intensive Care Unit and patient safety. **Rev Enferm Ref**; 4(3):45-53, 2014.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, I. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed Res Int**; 2016:2475067, 2016.

SANTOS, S. O.; ALVES, M. Sinopse taxonômica da família Lauraceae na porção norte da Floresta Atlântica brasileira. **Rev Bras Biociênc**; 11(1):14-28, 2013.

SCHEEL, L. D. The biological action of the coumarins. **Microbiol Toxins**; 8:47-66, 1972.

SHENKUTIE, A. M. et al. Biofilm-induced antibiotic resistance in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. **Antibiotics (Basel)**; 9(11):817, 2020.

SHIELDS, R. K. et al. Epidemiology, clinical characteristics, and outcomes of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections among solid organ transplant recipients. **PLoS One**; 7(12):e52349, 2012.

SHARMA, H. S. et al. Bacteriological profile of burn patients and antimicrobial susceptibility pattern of burn wound isolates. **Int Surg J**; 4(3):1019-1023, 2017.

SILVA, B. B. et al. Factors associated with multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: a pediatric intensive care unit case-control study. **Einstein (São Paulo)**; 20:eAO6704, 2022.

SILVA, G. K. F. et al. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares: trajetória e desafios em 30 anos do SUS. **Physis**; 30(1):e300110, 2020.

SILVA, R. O. et al. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chem Biol Interact**; 229:55-63, 2015.

SIMÕES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Nat Prod Rep**; 26(6):746-757, 2009.

SINGH, N. P. et al. Changing trends in antimicrobial susceptibility pattern of bacterial isolates in a burn unit. **Burns**; 43(5):1083-1087, 2017.

SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. **Braz Dent J**; 18(4):267-280, 2007.

SNYMAN, Y. et al. Clonal expansion of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Cape Town, South Africa. **Int J Infect Dis**; 91:94-100, 2020.

SOUSA, D. M. et al. Infecção por *Staphylococcus aureus* resistente em unidades de terapia intensiva: revisão integrativa. **Rev Enferm UFPE**; 10(4):1315-1323, 2016.

SPANU, T. et al. *In vivo* emergence of tigecycline resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**; 56(8): 4516-4518, 2012.

SPELLBERG, B.; REX, J. H. The value of single-pathogen antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov**; 12(12):963, 2013.

STAN, D. et al. Natural compounds with antimicrobial and antiviral effect and nanocarriers used for their transportation. **Front Pharmacol**; 12:723233, 2021.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**; 40(2):175-179, 2000.

STRYJEWSKI, M. E.; COREY, G. R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. **Clin Infect Dis**; 58(Suppl 1):S10-S19, 2014.

SUBRAMANI, R.; NARAYANASAMY, M.; FEUSSNER, K. D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. **3 Biotech**; 7(3):172, 2017.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiol**; 9: 222-227, 2001.

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infect Dis**; 18(3):318-327, 2018.

TAHAEI, S. A. S. et al. Correlation between biofilm-formation and the antibiotic resistant phenotype in *Staphylococcus aureus* isolates: a laboratory-based study in hungary and a review of the literature. **Infect Drug Resist**; 14:1155-1168, 2021

TAJUDIN, N. J.; ISMAIL, I. N. A. Antimicrobial activity of *Kalanchoe pinnata*: a review. **Malaysian J Sci Health & Technol**; 8(1), 2022.

TANG, C. et al. Epidemiology and outcomes of bloodstream infections in 177 severe burn patients from an industrial disaster: a multicenter retrospective study. **Clin Microbiol Infect**; 19:S1198-743X(17)30328-2, 2017.

THOMAS, G. et al. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl) tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Ness) Mez. (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea pig alveolar leucocytes. **J Pharm Pharmacol**; 46:103-107, 1994.

TIJANI, A.; SALLAU, M. S.; SUNUSI, I. Synergistic activity of methanolic extract of *Adenium obesum* (Apocyanaceae) stem bark and oxytetracycline against some clinical bacterial isolates. **Bayero J Pure Appl Sci**; 4:79-82, 2011.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Rev Liberato, Novo Hamburgo**; 14(22):113-238, 2013.

UDEGBUNAM, S. O. et al. Wound healing and antibacterial properties of methanolic extract of *Pupalia lappacea* Juss in rats. **BMC Complement Altern Med**; 14:157, 2014.

UMSCHEID, C. A. et al. Estimating the proportion of healthcare-associated infections that are reasonably preventable and the related mortality and costs. **Infect Control Hosp Epidemiol**; 32(2):101-114, 2011.

URBINATI, C. V. et al. Structure of the secondary xylem of *Aniba* Aubl. species from the Brazilian Amazon. **Acta Bot Brasilica**; 28(3):484-488, 2014.

UWINGABIYE, J. et al. *Acinetobacter* infections prevalence and frequency of the antibiotics resistance: comparative study of intensive care units versus other hospital units. **The Pan African Medical Journal**; 23:191, 2016.

van der WERFF, H.; RICHTER, H. G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Ann Mo Bot Gard**; 83:409-418, 1996.

van der WERFF, H. New taxa of Lauraceae from South America. **Novon**; 13(3):337-357, 2003.

van VUUREN, S. F. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. **J Ethnopharmacol**; 119:462-472, 2008.

van VUUREN, S.; HOLL, D. Antimicrobial natural product research: a review from a South African perspective for the years 2009-2016. **J Ethnopharmacol**; 17(208):236-52, 2017.

van VUUREN, S. F.; NKWANYANA, M. N.; de WET, H. Antimicrobial evaluation of plants used for the treatment of diarrhea in a rural community in northern Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa. **BMC Complement Altern Med**; 15:53, 2015.

VASCONCELOS, A. S. et al. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundam Clin Pharmacol**; 29:394-403, 2015.

VERSEY, Z. et al. Biofilm-innate immune interface: contribution to chronic wound formation. **Front. Immunol**; 12:648554, 2021.

VIEIRA, P. B.; PICOLI, S. U. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Rev Bras Ciênc Saúde**; 19(2):15115-6, 2015.

von POSER, G. L.; MENTZ, L. A. **Diversidades biológicas e sistema de classificação.** In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/URFSC, p.66-70, 2000.

VOULGARI, E. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? **Future Microbiol**; 8(1):27-39, 2013.

WAITE, Y, R. C. et al. Integration of water, sanitation, and hygiene for the control of neglected tropical diseases: a review of progress and the way forward. **Int Health**, 8 (Suppl 1) (2016):i22-i27, 2016.

WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M. J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **J Appl Microbiol**; 84:152-158, 1998.

WANG, J. et al. Literature review on the distribution characteristics and antimicrobial resistance of bacterial pathogens in neonatal sepsis. **J Matern Fetal Neonatal Med**, 35(5):861-870, 2022.

WEINER-LASTINGER, L. M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. **Infect Control Hosp Epidemiol**; 41(1):1-18, 2020.

WENTAO, N. et al. *In vitro* activity of minocycline combined with aminoglycosides against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. **J Antibiot**; (Tokyo). 71(5):506-513, 2018.

WERTHEIM, H. F. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infect Dis**, 5:751-762, 2005.

WHO, World Health Organization. **Programme on Traditional Medicine. (1998). Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review.** Geneva: WHO; 1998. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63801> Acesso em: 25 dez 2019.

WHO, World Health Organization. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.** Geneva: WHO; 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> Acesso em: 25 dez 2019.

WHO, World Health Organization. **Antimicrobial resistance.** Geneva: WHO; 2021a. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 21 mar 2022.

WHO, World Health Organization. **Meeting on the Promotion and Development of Traditional Medicine** (1977: Geneva) & World Health Organization. (1978). The promotion and development of traditional medicine: report of a WHO meeting. World

Health Organization; 1978. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40995>. Acesso em: 21 fev 2022.

WHO, World Health Organization. **Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report**. Geneva: WHO; 2021b. Disponível em: <https://www.amr-insights.eu/global-antimicrobial-resistance-and-use-surveillance-system-glass-report-2021/>. Acesso em: 25 fev 2022.

WOLCOTT, R. D. et al. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. **Wound Repair Regen**; 24:163-174, 2016.

WU, Y. K.; CHENG, N. C.; CHENG, C. M. Biofilms in chronic wounds: pathogenesis and diagnosis. **Trends Biotechnol**; 37:505-517, 2019.

YAMAGUCHI, K. K. L.; ALCÂNTARA, J. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amaz**; 42(4):541-546, 2012.

YANG, X. et al. Drug resistance of pathogens causing nosocomial infection in orthopedics from 2012 to 2017: a 6-year retrospective study. **J Orthop Surg Res**; 16:100, 2021.

YOUNG, L. S.; SABEL, A. L.; PRICE, C. S. Epidemiologic, clinical, and economic evaluation of an outbreak of clonal multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a surgical intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol**; 28(11):1247-1254, 2007.

ZAGO, J. A. A. Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains from human infections. **Braz J Pharmacogn**; 19(4):828-833, 2009.

ZAMAN, S. BIN et al. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. **Cureus**; 9(6):e1403, 2017.

ZARRILLI, R. et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. **J Infect Dev Ctries**; 3(5):335-341, 2009.

ZAJMI, A. et al. Ultrastructural study on the antibacterial activity of artonin e versus streptomycin against *Staphylococcus aureus* strains. **Plos One**; 10(6):e0128157, 2015.

ZHANG, W. et al. The role of Lpxa/c/d and pmra/b gene systems in colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. **Front Lab Med**; 1(2):86-91, 2017.

ZHAO, Y. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in ICU of the eastern Heilongjiang Province, China. **BMC Infect Dis**; 19(1):621, 2019.

ZHAO, Y. et al. A comprehensive review on mechanism of natural products against *Staphylococcus aureus*. **J Future Food**; 2(1):25-33, 2022.

ZHAOYUN, X. et al. The analysis of related factors for multiple bacterial infection in elderly patients with health care-related pneumonia. **Chinese J Geriatr**; 40(6):701-706, 2021.

ZHENG, J. Y. et al. Colistin for pneumonia involving multidrug-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **J Microbiol, Immunol Infect**; 53(6):854-865, 2020.

ZHU, Y.; HUAND, W. E.; YANG, O. Clinical perspective of antimicrobial resistance in bacteria. **Infect Drug Resist**; 15:735-746, 2022.

ZHU, W. et al. *In vitro* evaluation of antimicrobial combinations against imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of different MICs. **J Infect Public Health**; 11(6):856-860, 2018.

ZILBERBERG, M. D. et al. Multidrug-resistance, inappropriate empiric therapy, and hospital mortality in *Acinetobacter baumannii* pneumonia and sepsis. **Critical Care**; 20(1):221, 2016.

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **J Bacteriol**; 46:39-56, 1943.

ZOBELL, C. E.; ALLEN, E. C. Attachment of marine bacteria to submerged surfaces. **J Bacteriol**; 29:239-51, 1935.

**APÊNDICE A – ARTIGO 1: IN VITRO ACTIVITY OF RIPARIN III IN COMBINATION
WITH ANTIMICROBIALS AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT CLINICAL
ISOLATES OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND ACINETOBACTER
BAUMANNII**

Submitted to Journal Phytomedicine Plus. **Impact factor:** 6.656. **Qualis:** A1.

Jorge Belém Oliveira Júnior^{1*}, Fernanda Cristina Gomes de Lima², Elza Ferreira Firmo², Daivyane Aline Mota da Rocha¹, Jana Messias Sandes³, Stanley Juan Chavez Gutierrez⁴, Celso Amorim Camara⁵, José Maria Barbosa-Filho⁶, Luiz Carlos Alves^{1,3}, Fábio André Brayner^{1,3}.

¹Laboratory of Molecular and Cellular Biology, and Laboratory of Leishmaniasis and Mutagenesis, Department of Parasitology, Aggeu Magalhães Institute (FIOCRUZ/PE), Recife/Pernambuco, Brazil.

²Central Laboratory of Public Health of Pernambuco, Recife/Pernambuco, Brazil.

³Keizo Asami Institute, Federal Universidad of Pernambuco, Recife/Pernambuco, Brazil.

⁴Pharmacy Course Coordination, Federal Universidad of Piauí, Teresina/Piauí, Brazil.

⁵Department of Chemistry, Rural Federal Universidad of Pernambuco, Recife/Pernambuco, Brazil.

⁶Laboratory of Pharmaceutics Technology, Federal Universidad of Paraíba, João Pessoa/Paraíba, Brazil.

*Corresponding author: Jorge Belém Oliveira Júnior. Mailing address: Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Department of Parasitology in Institute Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife, Pernambuco. Phone: +51 81 2101-2693. E-mail: junniorbiologia@hotmail.com

ABSTRACT

S. aureus and *A. baumannii* are among the main bacterial species responsible for several infections worldwide due to the different resistance and virulence mechanisms, which can interfere with treatment. The use of antimicrobial combination is one of the therapeutic options; however, they may exhibit potential for nephrotoxicity and hepatotoxicity. Therefore, the use of natural compounds and antimicrobial combinations has been studied, considering the effectiveness of antimicrobial activity, and reduction of toxic effects. The aim of this study was to analyze the synergistic effect between riparin III and antimicrobials against *S. aureus* and *A. baumannii*, as well as possible ultrastructural changes induced for the synergistic combination. Riparin III and antimicrobial (ciprofloxacin, oxacillin, meropenem and colistin) against multidrug resistant (MDR) clinical isolates and MIC determination using microbroth dilution assay was performed. The checkerboard method and the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) were used to determine the type of interaction between the different antibiotics and riparin III, and the time-kill assays confirmed the results. Through Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) possible morphological changes in bacterial cells can be observed. *S. aureus* exhibited resistance to oxacillin, ciprofloxacin, and *A. baumannii* were both described as resistant to meropenem and isolate 54 was resistant to colistin. FICI for *A. baumannii* indicated synergism between riparin III and colistin, and MIC reversal revealed a maximal-fold significant reduction in MIC colistin in synergistic combinations. Checkerboard and time-kill demonstrated a potential for synergy in this combination against *A. baumannii* and showed bactericidal activity. Several ultrastructural changes in *A. baumannii* treated with the synergistic mixture were visualized for SEM and TEM, such as reduction in the cell number, rough appearance, in addition to indefinite morphologies and total defragmentation of the bacterial cell wall. Therefore, riparin III and colistin combination showed synergism against MDR *A. baumannii* and decrease in the MIC of colistin, as well as several ultrastructural changes in bacterial cells.

Keywords: Riparin III, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, Checkerboard method, Time-kill, Electron microscopy.

INTRODUCTION

Bacterial species, such as *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*, are responsible for hospital- and community-acquired infections worldwide (Bhatta et al., 2019; Chen et al., 2019; Dabaja-Younis et al., 2020; El Mekes et al., 2019; Kim et al., 2020; van Duin and Paterson, 2016; Wongsurakiat and Chitwarakorn, 2019). These species are two of the six ‘superbugs’ identified by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) as the “ESKAPE” group (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* species), and have recently been designated as category 2 (high) and 1 (critical), respectively, antibiotic resistant priority pathogen by the World Health Organization (de Oliveira et al., 2020; WHO, 2017).

Current treatment options for infections caused by *S. aureus* and *A. baumannii* are limited. Since there is no universally effective antimicrobial for all infections, one of the strategies is the combined use of antimicrobials (Wright, 2017). Thus, several studies report the efficiency of combination antimicrobial therapy for treatment of infections involving multidrug-resistant (MDR) bacterial species (Coronado-Álvarez et al., 2019; Firmo et al., 2020; Park et al., 2016; Wang et al., 2019; Zhu et al., 2018). However, antagonism is not uncommon in antimicrobial combinations (Moellering, 1983) and often there are possibilities of the emergence of bacterial resistance to antimicrobials as increasing selective pressure (Tyers and Wright, 2019).

In addition, some antimicrobials exhibit high potential for toxicity, including nephrotoxicity and hepatotoxicity (Baloch et al., 2017; Eljaaly et al., 2018; Roberts et al., 2015; Rutter and Burgess, 2018). These factors indicate that the use of natural products as sources for new antimicrobials and reduction of toxic effects is essential (Bush et al., 2014; Song et al., 2021; Wright, 2017).

Natural products and their derivatives have been recognized as a source in the development of new pharmaceutical agents, due to several biological activities (Araújo et al., 2016; Correa et al., 2019; Malafaia et al., 2018; Marchese et al., 2018; Oliveira Júnior et al., 2020; Wright, 2017). In addition, it is known that the natural products have been used as a promising in vitro therapeutic alternative for microorganisms involved in healthcare-associated infections (HAI) (Aleksic et al., 2014; Subramani et al., 2017). Riparin III (C₁₆H₁₇NO₄) is a natural alkamide obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez.

(Figure 1), and it is known to exhibit several biological activities, including antimicrobial activity against *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *K. pneumoniae* and *S. aureus* (Barbosa, 1988; Barbosa-Filho et al., 1987; Catão et al., 2005; Catão et al., 2010; Marques, 2001; Oliveira Júnior et al., 2020). Moreover, this natural compound exhibits biofilm inhibition in MDR *S. aureus*, low toxicity and promotes ultrastructural changes in MDR *S. aureus* and *A. baumannii* clinical isolates (Oliveira Júnior et al., 2020).

Several studies describe the synergistic activity of natural products combined with antimicrobials against bacterial species of medical importance (Aleksic et al., 2014; Lee et al., 2017; Silva et al., 2019; Sulieman et al., 2017; Torres et al., 2016). Sanhueza et al. (2017) evaluated the synergy between grape pomace extracts (*Vitis vinifera*), which is the main organic waste generated in the industries of wine, with antibiotics, including oxacillin and ciprofloxacin, against MDR *S. aureus* and *E. coli*. These combinations significantly reduced the MICs of oxacillin and ciprofloxacin against *S. aureus*, which can reduce side effects and treatment costs.

Bardbari et al. (2018) observed that both melittin (a 26-residue bee venom peptide) in combination with either colistin or imipenem combinations exhibit synergistic antibacterial activity against MDR *A. baumannii*; moreover, the synergistic combination of melittin/colistin completely inhibited biofilm production of this bacterial species. Another natural compound, pterostilbene (3',5'-dimethoxy-4-hydroxystilbene), is a resveratrol analogue isolated mainly from blueberries and grapes, appears to enhance polymyxin B activity *in vitro* and *in vivo*, and has a synergistic effect with colistin was also observed (Zhou et al., 2018).

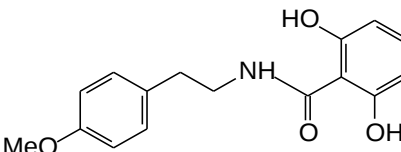
This study aimed to analyze the antimicrobial effect of riparin III in combination with antimicrobials against multidrug-resistant clinical isolates of *S. aureus* and *A. baumannii*, as well as possible ultrastructural changes induced by the synergistic combination.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining riparin III

Riparin III is a natural alkamide isolated from the unripe fruit or calyx of *Aniba riparia* (Ness) Mez. (Lauraceae) (Figure 1). This compound was chemically synthesized through the Schotten–Baumann reaction in the Laboratory of Pharmaceutics Technology (Barbosa-Filho et al. 1987; Castelo-Branco et al., 2000) and it was kindly provided. This compound belongs to the Lauraceae family and is chemically known as: *(O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl)-tyramine* or *N-[8'-(4'-methoxyphenylethyl)]-2,6-dihydroxy-benzoylamide* (Barbosa-Filho et al., 1987).

Figure 1 - Description of the chemical and molecular characteristics of riparin III.

Name	Chemical Class	Formula Chemical	Weight Molecular	Solubility	Structural Formula
Riparin III	Benzoyl-Tyramine	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	287	Cremophor, DMSO, Tween 80	

Barbosa-Filho et al. 1987.

Antimicrobial agents

The conventional antimicrobials used for testing in combination with riparin III were: oxacillin, ciprofloxacin, meropenem and colistin Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Solutions of antimicrobials were prepared according to CLSI (2019) and stored at -20°C.

Multidrug-resistant clinical isolates

Riparin III and the antimicrobials, each on its own were tested against multidrug-resistant (MDR) clinical isolates of *S. aureus* and *A. baumannii*. Clinical isolates were obtained from two public hospitals in Pernambuco/Brazil by spontaneous demand and surveillance between 2013 and 2014 (Table 1). Bacterial identification and determination of antimicrobial resistance profile were obtained by VITEK 2 (Biomérieux) automated system, provided by the source hospitals, followed by laboratory confirmation. In the study, two MDR bacterial isolates of each species were

selected, being carriers of resistance and virulence genes and have no clonal relationship (unpublished data).

Bacterial activation was performed with 30 µl of the stock (bacterial isolates were stored in 20% glycerol) of each clinical isolate that were inoculated in BHI (Brain Heart Infusion) broth for microbial enrichment. Then, they were incubated for 18-24 h in a bacteriological oven at 37±1 °C. After this period, they were seeded in a BHI agar culture medium and incubated in an oven at 37±1 °C for 18-24 h for cultivation and bacterial isolation. The concentration of bacterial cells (1.5×10^8 CFU/ml), adjusted to match the turbidity standard of 0.5 McFarland of MDR clinical isolates.

Table 1 - Antimicrobial resistance profile of clinical isolates obtained from public hospitals in Recife/Pernambuco/Brazil.

BACTERIAL SPECIES	ISOLATES	HOSPITALS	RESISTENCE
<i>A. baumannii</i>	54	A	AMK, AMP, CAZ, CIP, CPM, CRO, CST, GEN, IPM, MEM
<i>A. baumannii</i>	808	B	ACR, AMP, CAZ, CIP, CPM, CRO, CRX, GEN, IPM, MEM
<i>S. aureus</i>	170	A	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	382	B	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN

Legend: A, hospital 1; B, hospital 2; ACR, Axetilcefuroxima; AMK, Amikacin; AMP, Ampicillin; CAZ, Ceftazidime; CIP, Ciprofloxacin; CLI, Clindamycin; CPM, Cefepime; CRO, Ceftriaxone; CRX, Cefuroxime; CST, Colistin; ERI, Erythromycin; GEN, Gentamicin; IPM, Imipenem; MOX, Moxifloxacin; MEM, Meropenem; NOR, Norfloxacin; OXA, Oxacillin; PEN, Benzylpenicillin.

Preparation of standard solutions

The stock solution of riparin III were prepared separately in DMSO at a concentration of 1 mg/ml and stored at room temperature. The antimicrobials were diluted in ultrapure water and stored according to the manufacturer.

Minimum Inhibitory Concentration

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of riparin III and each antimicrobial were determined against MDR *S. aureus* and *A. baumannii* through the microdilution broth in 96-well microplates containing Mueller Hinton Broth 2 cation-adjusted. The microdilution of riparin III was performed at concentrations of 400 to 3.125 µg/ml (Catão et al. 2005; Oliveira Júnior et al., 2020) and antimicrobials tested were tested according

to CLSI standards (2019). Bacterial suspension was then adjusted to 0.5 McFarland, added, and incubated for 18-24 h at $36^{\circ}\text{C}\pm 1$. Each experiment was performed including negative control (culture medium, ultrapure water, riparin III and each antimicrobial alone) and positive control (culture medium with bacterial isolate tested). Results were analyzed for turbidity, indicating that the last concentrations that did not exhibit visible bacterial growth were considered the MIC (CLSI, 2019).

Thus, results were later confirmed with colorimetric test; thus, 20 μl of resazurin were added to each microplate well to analyze bacterial cell viability by colorimetry. After 2 h, the presence of the blue color represents the absence of bacterial cell growth and the pink color, results in the presence of bacterial growth (Palomino et al. 2002). The tests were performed in triplicate, using the *Escherichia coli* strain (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 29213) and *A. baumannii* (ATCC 19606) as a quality control (CLSI, 2019).

Checkerboard method

The activity of riparin III in combination with each antimicrobial was analyzed in duplicate with Mueller Hinton Broth 2 cation-adjusted using the checkerboard broth microdilution method in a 96-well microplate (Wentao et al., 2018). Then, a dilution calculation was performed to obtain a 2x MIC concentration of each antimicrobial and riparin III. Each experiment was performed containing negative (culture medium, ultrapure water, riparin III and each antimicrobial alone) and positive control (culture medium with bacterial isolate tested).

Checkerboard was performed in an 8x8 well configuration with dilution directly into the plate. The highest concentration of riparin III was present in the first well and the lowest concentration in the last well of the first row of the plate and was diluted in the vertical direction to the last row; each antimicrobial was diluted in the horizontal direction, exhibiting a constant relationship between component doses.

The Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) calculated as: $\text{FICI} = \text{MIC of drug A in combination} / \text{MIC of drug A alone} + \text{MIC of drug B in combination} / \text{MIC of drug B alone}$. Riparin III/oxacillin and riparin III/ciprofloxacin combinations were tested in *S. aureus*, while in *A. baumannii*, the riparin III/meropenem and riparin III/colistin combinations were evaluated. After, 30 μl of inoculum adjusted in 0.5 McFarland were added and incubated for 24 h at $36^{\circ}\text{C}\pm 1$. The results were confirmed with resazurin

(Palomino et al. 2002). The calculated FICI was interpreted as synergy ($FICI \leq 0.5$), no interaction ($0.5 < FICI \leq 4.0$) or antagonism ($FICI > 4.0$), according to Odds (2003).

MIC reversal

To determine the ability of riparin III to potentiate the effect of each antibiotic, the Modulation Factor (MF) was calculated as MIC_{Drug}/MIC_{Drug} in combination for each synergistic combination (Kaur et al., 2018).

Time-kill

The rate of bacterial killing over time was performed only in the combinations found to be synergistic by the checkerboard method. Therefore, in *A. baumannii* 54, a solution of riparin III at 50 µg/ml, a solution of colistin at 1 µg/ml and a solution of the synergistic mixture riparin III/colistin at 50 µg/ml / 1 µg/ml, and in *A. baumannii* 808, a solution of riparin III at 100 µg/ml, a solution of colistin at 0.25 µg/ml and a solution of the synergistic mixture riparin III/colistin at 100 µg/ml / 0.25 µg/ml were prepared in CA-MHB and then a bacterial suspension (1×10^8 CFU/ml) was added. In parallel, a control containing only the bacterial inoculum (growth control) was prepared.

The time-kill curve was investigated briefly using microdilution in broth and bacterial suspensions were adjusted to 0.5 McFarland turbidity standard (1×10^8 CFU/ml) with CA-MHB. Aliquots were removed from each test solution for colony count determination at 0, 3, 6, 12 and 24 h (Klepser et al., 1998; Wentao et al., 2018). At each hour, 1 µl aliquot of the sample was removed from the wells to be diluted (1:1000) with saline (0.9% NaCl) and plated in Mueller Hinton agar, followed by incubation at $36^\circ\text{C} \pm 1$ for 24 h prior to determination of colony counts. Then, bacterial colonies were counted after 24 h. All the *in vitro* time-kill experiments were performed in triplicate and the results were constructed by plotting mean colony counts ($\log_{10}$ CFU/ml) vs. time.

Bactericidal was defined as a reduction of 99.9% ($\geq 3 \log_{10}$) of the total number of CFU/ml in the original inoculum at 24 h. Bacteriostatic was defined as maintenance of the original inoculum concentration or a reduction of less than 99.9% ($< 3 \log_{10}$) of the total number of CFU/ml in the original inoculum at 24 h. Synergistic interaction was defined as $\geq 2 \log_{10}$ decrease in CFU/ml between the combination and its most active constituent after 24 h. Indifference was defined as $\log_{10}$ CFU/ml reduction in colony count at 24 h by the combination compared with the most active single agent.

Antagonism was described as log₁₀ increase in CFU/ml after 24 h between the combination and the most active agent (Tang et al., 2017).

Scanning electron microscopy

The SEM was analyzed only on the combinations found to be synergistic by the checkerboard method. All bacterial inocula were adjusted in the concentration bacterial cells (1.5×10^8 CFU/ml) equivalent to match the turbidity standard of 0.5 McFarland and were subjected to $\times 0.5$ MIC of the combinations, riparin III and colistin for 8 h. They were washed in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) and fixed in Karnovisk (0.1M phosphate buffer and 2.5% glutaraldehyde) (Sigma-Aldrich). Post-fixation was performed with 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Science) in 0.1M phosphate buffer for 90min and dehydration using ethanol (Sigma-Aldrich) was realized. After, critical point and assembly in metal stubs were realized using a double carbon tape, followed by metallization, and viewing of the bacterial cells under a scanning electron microscope (JEOL JSM-5600 LV) (Oliveira Júnior et al. 2020).

Transmission electron microscopy

Bacterial cells were investigated only on the combinations found to be synergistic by the checkerboard method. All bacterial inocula were adjusted in the concentration bacterial cells (1.5×10^8 CFU/ml) equivalent to match the turbidity standard of 0.5 McFarland, in addition to subjected to $\times 0.5$ MIC of the combinations at 8h. Then, they were washed in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4), centrifuged for 524g and fixed in Karnovisk (0.1M phosphate buffer and 2.5% glutaraldehyde) (Sigma Aldrich) for 60min, followed by three washes in 0.1M phosphate buffer for 10min, post-fixation in 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Science) in 0.1M phosphate buffer (pH 7.2) for 90min. Dehydration was performed with acetone (Sigma Aldrich) and infiltration with Epon 812 resin (Electron Microscopy Science) to perform ultrathin cuts, which were contrasted with uranyl acetate and lead citrate (Electron Microscopy Science) and observed in transmission electron microscope (FEI Tecnai™ Spirit G2 BioTWIN) (Oliveira Júnior et al. 2020).

RESULTS

Minimum inhibitory concentrations (MIC) of riparin III were evaluated alone and in combination with antimicrobials representative of different classes (penicillin, quinolones, carbapenem and polymyxin) in MDR clinical isolates. Each experiment was performed containing negative and positive control, as well as control strains: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 and *A. baumannii* ATCC 19606. The MIC indicated that *S. aureus* isolates exhibited a resistant phenotype to oxacillin and ciprofloxacin, and *A. baumannii* were both described as resistant to meropenem; however, only isolate 54 was resistant to colistin (Table 2), according to the CLSI (2019). Then, the bacterial cell viability was confirmed with resazurin (20 µL). Overall, the MIC values of riparin III were 50 and 400 µg/ml against *S. aureus* and *A. baumannii*, respectively, and ATCC strains (ATCC 29213 *S. aureus*; ATCC 19606 *A. baumannii*) used to analyze the viability of antimicrobials presented the breakpoint described by CLSI (2019).

Table 2 - Minimum inhibitory concentration of riparin III and antimicrobials of multidrug-resistant clinical isolates obtained from public hospitals in Recife/Pernambuco/Brazil.

Isolates		MIC (µg/ml)				
		Riparin III	Antimicrobials			
			OXA	CIP	MEM	CST
<i>S. aureus</i>	170	50 µg/ml	32	128	-	-
	382		32	128	-	-
	ATCC 29213		0.125	0.25	-	-
<i>A. baumannii</i>	54	400 µg/ml	-	-	128	16
	808		-	-	64	1
	ATCC 19606		-	-	-	-
<i>E. coli</i> *	ATCC 25922	-	-	-	0.03125	0.5

Legend: MIC, Minimum Inhibitory Concentration; CIP, Ciprofloxacin; CST, Colistin; MEM, Meropenem; OXA, Oxacillin; -, no applicable. **Escherichia coli* strain used for MIC determination according to CLSI (2019).

Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) was then calculated to estimate the strength of the synergism. The FICI was 0.125 and 0.375 for *A. baumannii* 54 and 808, respectively, indicating strong synergism between riparin III and colistin. No antagonistic effect was observed at any concentration of riparin III combined with each antimicrobial. In *S. aureus*, the riparin III/oxacillin and riparin III/ciprofloxacin combinations showed an indifferent effect. This result can also be observed in the riparin III/meropenem combination in both evaluated strains of *A. baumannii*, and hence, we explored the ability of riparin III to reverse the MIC of colistin in this species (Table 3). Thus, it was observed that riparin III associated with colistin can potentiate the antimicrobial action in the evaluated isolates, due to the decrease in the concentrations used.

Table 3 - Antimicrobial activity of riparin III combined antimicrobials against multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*.

Isolates	MIC (µg/ml)							
	Riparin and Oxacillin				Riparin and Ciprofloxacin			
	RIP	OXA	FICI	TYPE OF INTERACTION	RIP	CIP	FICI	TYPE OF INTERACTION
<i>S. aureus</i> (170)	25	0.5	0.5156	I	25	2	0.5156	I
<i>S. aureus</i> (382)	25	0.5	0.5156	I	25	2	0.5156	I
Isolates	Riparin and Meropenem				Riparin and Colistin			
	RIP	MEM	FICI	TYPE OF INTERACTION	RIP	CST	FICI	TYPE OF INTERACTION
<i>A. baumannii</i> (54)	100	64	0.750	I	25	1.0	0.125	S
<i>A. baumannii</i> (808)	6,25	64	1.010	I	50	0.25	0.375	S

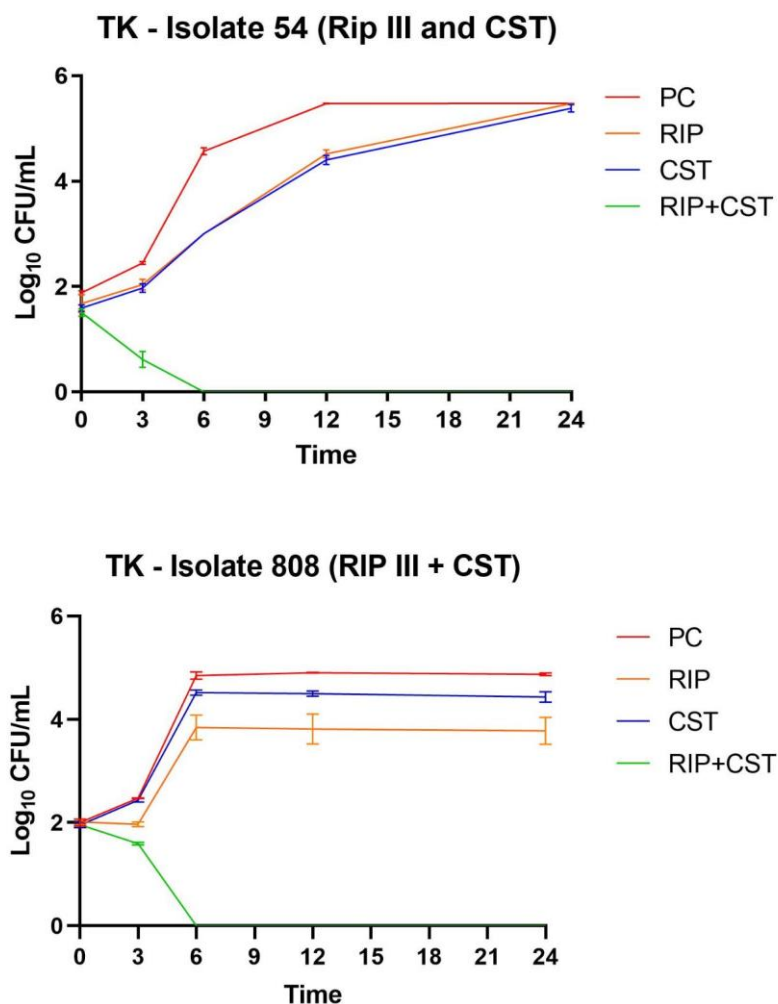
Legend: MIC, Minimum Inhibitory Concentration; RIP, Riparin III; CIP, Ciprofloxacin; CST, Colistin; MEM, Meropenem; OXA, Oxacillin; FICI, Fractional Inhibitory Concentration Index; S – Synergism; I, Indifferent.

Analysis of the riparin III/antimicrobial combinations resulting in growth inhibition revealed that, in most cases, MIC values were remarkably affected or moderately

affected in *A. baumannii* (54) and (808). Against *A. baumannii* (54) there was a decrease up to 16-fold in both riparin III and colistin showing that riparin at 25 µg/ml effectively reduced the MIC of colistin from 16 to 1 µg/ml against *A. baumannii*, as represented by an Modulation Factor (MF) of 16 times, while the MIC of colistin in *A. baumannii* (808) was affected with a decrease up to 4-fold from 1 to 0.25 µg/ml in the presence of riparin III at 50 µg/ml.

Time-kill curves were performed only on the combinations found to be synergistic by the checkerboard. Moreover, this method was used to observe the effect (bactericidal or bacteriostatic) of the synergistic mixtures (riparin III and colistin), compared to these components alone, and to determine the type of interaction between the components of the mixtures (synergistic, indifference and antagonism). The control growth curves for inocula paralleled each other until the 12-h time point for each of the isolates. In the results, a bactericidal effect was observed in both isolates (*A. baumannii* 54 and 808), since the riparin III/colistin combination allowed a bacterial reduction of 99.9% ($\geq 3\log_{10}$) in 6 h compared to riparin III and colistin alone, which did not impede bacterial growth in 24 h. Furthermore, given a difference $\geq 2\log_{10}$ decrease in CFU/ml between the combination (riparin III and colistin) and the most active component alone in the growth control curve after 24 h, there is a synergistic interaction. In both experiments, the positive control exhibited correct growth (Figure 2) and no bacterial growth in the negative control.

Figure 2 - Time-kill curves of riparin III combined colistin against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates (54 and 808) submitted to the sub-synergistic concentration of the combination (riparin III/colistin).

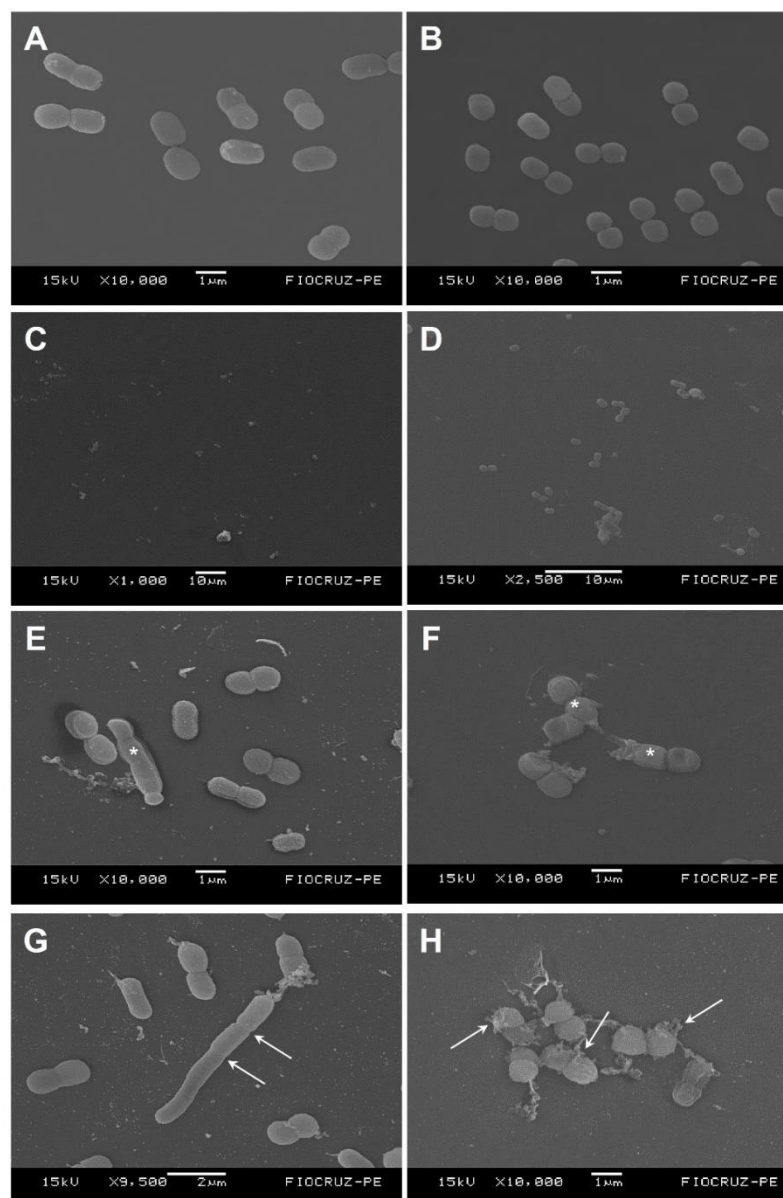


Legend: PC, Positive Control; RIP III, Riparin III; CST, Colistin. Isolate 54 submitted to riparin III (12.5 µg/ml) and colistina (0.5 µg/ml). Isolate 808: submitted to riparin III (25 µg/ml) and colistina (0.125 µg/ml).

SEM and TEM were performed only on the combinations found to be synergistic by the checkerboard. Cells of *A. baumannii* 54 were subjected to riparin III (200µg/ml) and colistin (8µg/ml) alone, and riparin III/colistin (12.5µg/ml/ 0.5µg/ml) combination. In relation to *A. baumannii* 808 cells were exposed to riparin III (200µg/ml) and colistin (0.5µg/ml) alone, and riparin III/colistin (25µg/ml/ 0.125µg/ml) combination. In SEM, control cells of *A. baumannii* (54 and 808) showed intact surface without morphological changes with structures in coccobacilli (Figure 3A-B). However, for the bacterial cells subjected to riparin III and colistin alone, a reduction in the cell number and changes

in apparent morphology, as well as rough appearance/protrusions in the cell wall were observed (Figure 3C-F). Moreover, cell elongation without division and cell lysis with extravasation of cytoplasmic material was viewed (Figure 3G-H).

Fig. 3 - Ultrastructural changes induced by the action of riparin III and colistin alone, and riparin III/colistin combination in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* (54 and 808) by scanning electron microscopy.



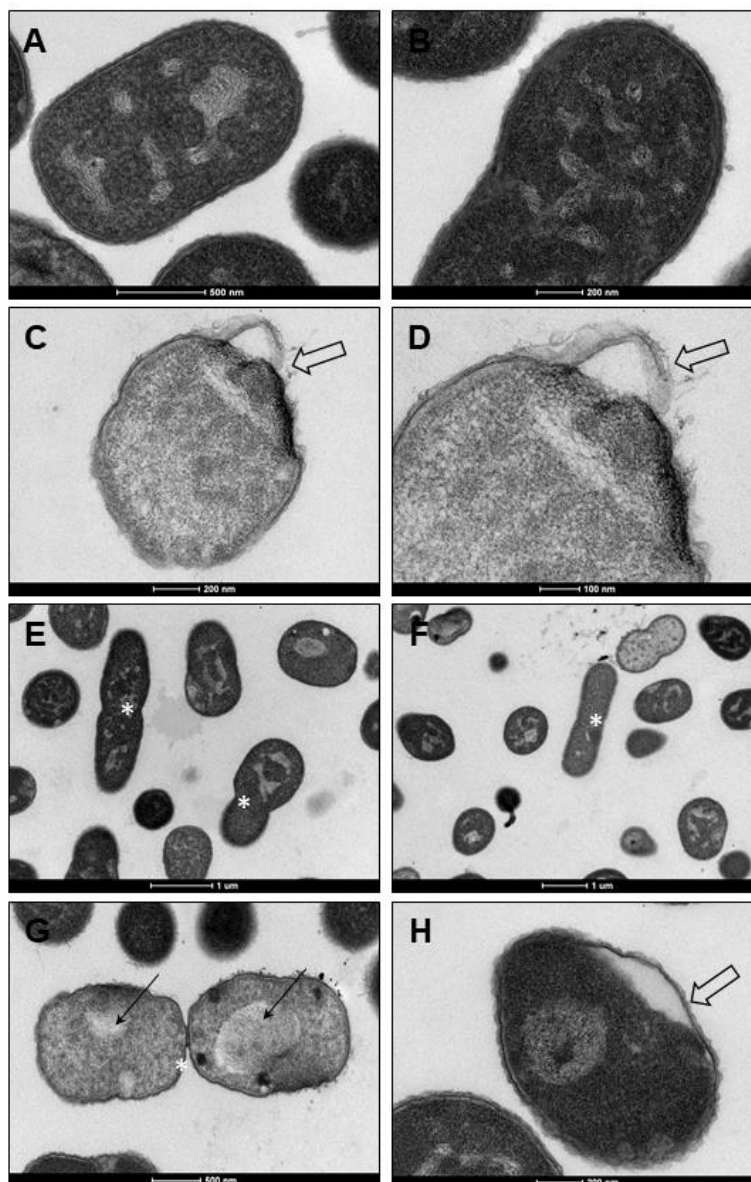
Legend: (A, C, E and G) *Acinetobacter baumannii* isolated 54 cells, (A) *A. baumannii* control with preserved morphology and size. (C) cells subjected to colistin (8 µg/ml) observe a significant reduction in the number of bacterial cells; (E) Cells exposed to riparin III (200 µg/ml) note morphological change (asterisk) with rough appearance/bulges on the cell wall surface and (G) cells subjected to riparin III and (12.5 µg/ml) and colistin (0.5 µg/ml) combination note cell elongation (arrows) and absence of septum

formation. **(B, D, F and H)** *Acinetobacter baumannii* isolated 808 cells, **(B)** *A. baumannii* control with preserved morphology and size. **(D)** cells subjected to colistin (0.5 µg/ml) observe a significant reduction in the number of bacterial cells; **(F)** Cells exposed to riparin III (200 µg/ml) note cells with altered morphology (asterisks) with a rough appearance on the cell wall surface and **(H)** cells subjected to the riparin III (25 µg/ml) and colistin (0.125 µg/ml) combination note several cells with altered morphology with extravasation of cytoplasmic content (arrows).

Analysis of the inside of the control cells of *A. baumannii* (54) and (808) by TEM revealed well-preserved structures, respectively (Figures 4A-B and 5A-B). *A. baumannii* 54 were subjected to riparin III at 200µg/ml and colistin at 8µg/ml alone, and riparin III/colistin at 12.5µg/ml/ 0.5µg/ml combination. Bacterial cells exposed to riparin III and colistin alone presents a discontinuous cell wall, indefinite morphologies, and heterogeneity in electron density (Figure 4C-F). Subjected to riparin III/colistin combination indicated morphological change, electron-lucent areas in the cytoplasm and rough appearance in the cell wall, as well as separation of cell envelope layers (Figure 4G-H).

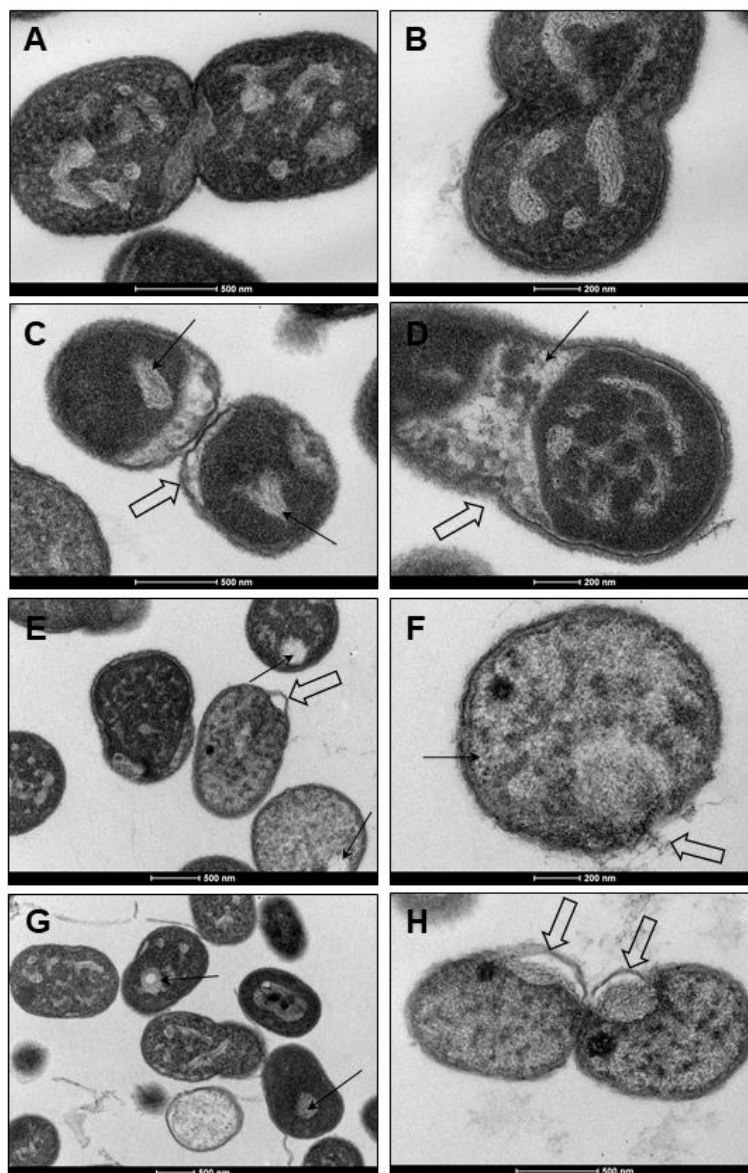
Regarding the *A. baumannii* 808, when subjected to riparin III (200µg/ml) and colistin (0.5µg/ml) alone exhibited the electron-luscent space and broken walls and membranes, as well as huge intracellular vacuoles and total defragmentation of the bacterial cell wall (Figure 5C-F). Bacterial cells exposed to riparin III/colistin combination (25µg/ml/ 0.125µg/ml) showed intracellular vacuoles, lytic zones, and total defragmentation of the bacterial cell wall, indefinite morphology and rough appearance in the cell wall, and separation of cell envelope layers were observed (Figure 5G-H).

Fig. 4 - Transmission electron microscopy of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* (54) submitted to riparin III and colistin alone, and riparin III/colistin combination.



Legend: (A and B) Control cell of *Acinetobacter baumannii* 54, with preserved size and morphology; (C and D) *A. baumannii* 54 submitted to riparin III (200 µg/ml) has a discontinuous of membrane and cell wall (open arrow), undefined morphologies and a lucent electron area in the cytoplasm; (E and F) *A. baumannii* 54 exposed to colistin (8 µg/ml), presents altered morphology with the presence of elongated cells without septal formation (asterisk); (G and H) *A. baumannii* 54 submitted to riparin III/colistin combination (12.5 µg/ml/ 0.5 µg/ ml), presence of cells with morphological changes (asterisk) and electron lucent areas (long arrow) in the cytoplasm. Also note disorganization in the membrane and cell wall (open arrow).

Fig. 5 - Transmission electron microscopy of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (808) clinical isolates by the action of riparin III and colistin alone, and riparin III/colistin combination.



Legend: (A and B) Control cells of *Acinetobacter baumannii* 808 with preserved size and morphology; (C and D) *A. baumannii* 808 submitted to riparin III (200 µg/ml), the cells show disarrangement in the membrane and cell wall (open arrow), in addition to exhibiting electronlucent spaces in the cytoplasm (long arrow); (E and F) *A. baumannii* 808 exposed to colistin (0.5 µg/ml), cells showing electronlucent spaces (long arrows) and total membrane defragmentation, and discontinuous membrane and cell wall (open arrow); (G and H) *A. baumannii* 808 submitted to riparin III/colistin combination (25 µg/ml/ 0.125 µg/ml) present cells with irregular morphology, presence of electronlucent spaces (long arrows), and discontinuity of the membrane and cell wall (open arrow).

DISCUSSION

Plants and their products are the key source for drugs, being considered alternative medicine for fighting against diseases since ancient times (Subramani et al., 2017). However, since the arrival of antimicrobials in the 1950s, the use of plant products with antimicrobial action has become literally non-existent (Cowan, 1999). Several researches are engaged in plant products as drugs as they are indisputable substitutes for the antimicrobials prescribed in clinical therapy (Bakal et al., 2017; Cowan, 1999).

The use of plant products has been broadly discussed, due to the recurrent identification of MDR clinical isolates involved in HAI. The current and still increasing problem of multidrug resistance (Farlow et al., 2019) in *S. aureus* and *A. baumannii* clinical isolates, and MRSA strains diffusion, and the antimicrobial profile of the natural compounds can be considered as essential of natural formulations (Cowan, 1999; Subramani et al., 2017). Also, they are not associated with side effects, they are cheaper, come from renewable sources and have greater acceptance due to a long history of use (Chanda and Rakholiya, 2011).

Some studies have described the antimicrobial activity of chalice and unripe fruit extracts of *A. riparia* (Nees) Mez. in bacterial and fungal strains (Barbosa et al., 1988; Barbosa-Filho, 1987). After isolating the riparins I, II and III, Catão et al. (2005) inferring their antimicrobial activity in *S. aureus* and *E. coli*, and 2010, the authors determined the MIC of the riparin III in methicillin-sensitive *S. aureus* obtained from bovines from 100 µg/ml in ATCC 25923 and 200 µg/ml in 122U strain. Our data confirms the MICs obtained from the study by Oliveira Júnior et al. (2020), and it was possible to determine the MIC of riparin III in MDR *S. aureus* (50 µg/ml) and *A. baumannii* (400 µg/ml) clinical isolates.

A large study describes the synergistic effect between the natural compounds or extracts and antimicrobials through the systematic screening of plant-derived bioactive compounds, including those that can synergistically act with antibiotics (Stefanovic, 2017). The author ensures that plant extracts possess antibacterial actions, and it can also increase the ability to enhance the activity of an antibiotic in combination with it, so that bacteria become sensitive to antibiotic or the antibiotic acts when in lower concentrations.

Other studies indicate that the use of natural products combined with antimicrobials promotes a significant reduction of the MIC of antimicrobials for bacterial strains (Cannatelli et al., 2018; Fazly Bazzaz et al., 2016; Guo et al., 2021; Moussaoui and Alaoui, 2016; Sanhueza et al., 2017; Silva et al., 2019). The present study confirms this finding by analyzing the riparin III, a natural alkamide, obtained from the unripe fruit or calyx of *A. riparia* (Ness) Mez., and conventional antimicrobials alone and combination; therefore, it can be inferred that the combination riparin III and colistin is quite effective *in vitro* against *A. baumannii*, due to the synergistic action and significant decrease in the MIC of the antibiotic and natural compound.

Monotherapy and combination antimicrobial therapy are known to be widely used against bacterial infections (Firmo et al., 2020). The antimicrobials can have some drawbacks, which are limited to increased resistance, neurotoxicity, nephrotoxicity, and hepatotoxicity (Baloch et al., 2017; Eljaaly et al., 2018; Nation; Li, 2009; Roberts et al., 2015; Rutter and Burgess, 2018; Tuon et al., 2015). In this way, our study assures the importance of using the colistin and riparin III in combination, given the low *in vitro* toxicity of this natural compound, as confirmed in a previous study on riparin III (Oliveira Júnior et al., 2020).

Although the analysis of mechanisms of action is essential in the search for new molecules for therapeutic use, it is important to emphasize that the synergistic action that exists between natural and antimicrobial compounds are decisive in their effects. Thus, comparing the action of natural compounds with antimicrobials is an adequate approach to determine their effectiveness (Bona et al., 2019). Furthermore, Cannatelli et al. (2018) ensure that synergistic antimicrobial activity did not appear to be dependent on species or the resistance mechanism. In this sense, we can infer that riparin III can potentiate the antimicrobial action of colistin against MDR *A. baumannii*.

Kaur et al. (2018) analyzed the potential of curcumin in combination with antibiotics, including colistin, against MDR *A. baumannii*. It was observed that this compound and colistin combination effectively reduced the MIC of colistin from 2 to 0.5 µg/ml, as represented by an MF 4. Other studies describe a decrease in colistin MIC when associated with some natural compound. Our data demonstrate a very significant decrease in riparin and colistin combination in both bacterial isolates analyzed; however, the isolate 54 exhibits MF 16-times. These data were confirmed by calculating the MF (MIC_{alone}/MIC_{comb}).

Liu et al., (2016) observed a synergistic effect of meropenem and colistin against all 12 *A. baumannii* with FICI ≤ 0.5 . On the other hand, in this study, the FICI was 0.125 and 0.375 for *A. baumannii* 54 and 808, respectively, in riparin III and colistin combination. This demonstrates that further studies with natural compounds associated with antimicrobials should be carried out.

There has been a surge in reports of infections caused by some bacteria, such as *A. baumannii*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* (Falagas et al., 2006; Kurihara et al., 2020; Perez et al., 2020; Rangel et al., 2021; Zuniga-Moya et al., 2020), developing resistance to polymyxins in a process referred to as acquired resistance, whereas other bacteria, such as *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., and *Morganella* spp. are naturally resistant to these drugs (Olaitan et al., 2014). Thus, there is urgency to optimize the clinical use of polymyxin by designing effective combination therapies (Falagas et al., 2006).

In addition, since the efficacy of colistin monotherapy is low against colistin-resistant isolates (Kwa et al., 2007), a combination therapy of colistin and riparin III may suggest *in vivo* analysis due to significant results in combined therapy in this study.

Several studies demonstrate ultrastructural changes in bacterial cells caused by the combination of antimicrobials. Cushnie et al. (2016) describe the possible morphological and ultrastructural changes in bacterial cells induced by antiseptics, disinfectants, and antibacterial drugs. Thus, numerous ultrastructural changes corroborate the characteristics observed through the riparin III and colistin combination against *A. baumannii*, such as rough appearance/protrusions in the cell wall, cell elongation without division, intracellular vacuoles, and lytic zones.

Fam et al. (2017) indicated the presence of ballooning and distention of cells to disruption and cell lysis with extravasation of cytoplasmic material after their exposure to doripenem and colistin combination. Another study analyzed the IVIG/meropenem, IVIG/colistin, IVIG/amikacin, meropenem/colistin and meropenem/amikacin combinations, and several ultrastructural changes were observed, including cell rupture and elongation, depression on the membrane surface, lumpy cells, incomplete cell division, cell depression on the membrane surface, and wrinkling on the cell surface (Lima et al., 2020). A previous study (Oliveira Júnior et al., 2020) describes the possible ultrastructural changes caused by riparin III alone, such as: elongated cells

without visualization of the bacterial septum, numerous cells with a rugged structure on the cell surface. This study corroborates the studies cited, inferring that the riparin III and colistin combination is effective against *A. baumannii*, which exhibits numerous ultrastructural changes, such as: cell elongation without division and cell lysis with extravasation of cytoplasmic material.

Therefore, this is the first report to investigate the combinatorial effect of riparin III with conventional antimicrobials in MDR clinical isolates from *S. aureus* and *A. baumannii*, as well as MF, SEM and TEM. Among the in combination with antibacterial, different effects were observed with indifferent being the most frequent interaction.

CONCLUSION

Riparin III and colistin combination showed an excellent synergistic activity against MDR *A. baumannii*, as well as a very significant decrease in the MIC of colistin, which is important given its high cytotoxic potential. In addition, this in combination with antimicrobials caused numerous ultrastructural changes in bacterial cells. These data are quite relevant, given the increasing development of antimicrobial resistance by bacterial agents involved in HAI.

Thus, this study demonstrated the therapeutic potential of the combination between riparin III and colistin against *A. baumannii*, suggesting additional studies, including in vivo and clinical trials analysis, and we can conclude that the use of natural compounds associated with antimicrobials may have a promising effect on bacterial agents, indicating a new treatment option for MDR infections.

ACKNOWLEDGMENT

Thanks to Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez and Dr. José Maria Barbosa-Filho who kindly provided the products evaluated in this study. This work was supported by National Institute of Science and Technology – Rennofito/CNPq (Process nº 465,536/2014–0) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support. This work was developed at the Aggeu Magalhães Institute (FIOCRUZ/Pernambuco/Brazil) and Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA/Federal University of Pernambuco/Brazil).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Aleksic, V. et al., 2014. Synergistic effect of *Myrtus communis* L. essential oils and conventional antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* wound isolates. *Phytomedicine*. 21(12):1666-1674. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.08.013>.
- Araújo, E.J.F., et al., 2016. In vitro antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkamides from *Aniba riparia* (Lauraceae). *Acta Amazon*. 46(3):309-314. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201505436>
- Bakal, S.N., Bereswill, S., Heimesaat, M.M., 2017. Finding Novel Antibiotic Substances from Medicinal Plants - Antimicrobial Properties of *Nigella Sativa* Directed against Multidrug-resistant Bacteria. *Eur J Microbiol Immunol*. 7(1): 92–98. <https://doi.org/10.1556/1886.2017.00001>.
- Barbosa-Filho, J.M. et al., 1987. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry*. 26(9):2615-2617. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83890-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83890-X)
- Barbosa, R.C.S.B.C. et al., 1988. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. *Acta Amazon*. 8(1/2):91-94. Suplemento. <https://doi.org/10.1590/1809-43921988185094>
- Bardbari, A.M. et al., 2018. Highly synergistic activity of melittin with imipenem and colistin in biofilm inhibition against multidrug-resistant strong biofilm producer strains of *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 37(3):443-454. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3189-7>
- Baloch, Z.Q. et al. 2017. Ciprofloxacin-induced hepatotoxicity in a healthy young adult. *Cureus*. 9(2): e1016. <https://doi.org/10.7759/cureus.1016>
- Bhatta, D.R. et al. 2019. Burden of multidrug resistant respiratory pathogens in intensive care units of tertiary care hospital. *Asian J Med Sci*. 10(2):14-19. <https://doi.org/10.3126/ajms.v10i2.21098>

- Bona, G.S. et al. 2019. Dual Mode of Action of Grape Cane Extracts against *Botrytis cinerea*. J. Agric Food Chem. 67(19):5512-5520. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07098>
- Bush, K. et al. 2014. Tackling antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. 9(12):894-896. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2693>
- Cannatelli, A. et al., 2018. Synergistic activity of colistin in combination with resveratrol against colistin-resistant Gram-negative pathogens. Front Microbiol. 7;9:1808. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01808>
- Catão, R.M.R. et al., 2005. Evaluation of the antimicrobial activity about multiresistents samples of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Rev Bras Anál Clín. 37(4): 247-249.
- Catão, R.M.R. et al. 2010. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Anál Clin. 42(1): 09-14.
- Castelo-Branco, U.V., Castelo Branco, U.J.V., Thomas, G., Araujo, C.C., Barbosa Filho, J.M. 2000. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae). Acta Farm. Bonaerense. 19(3), 197-202.
- Chanda, S., Rakholiya, K., 2011. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajos/ Spain: Formatex, p. 520-529.
- Chen, Y. et al. 2019. Clinical characteristics, risk factors, immune status and prognosis of secondary infection of sepsis: a retrospective observational study. BMC Anesthesiol. 19(1):185. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12871-019-0849-9>
- CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29^a ed. CLSI suplemento M100. Wayne PA: Clinical & Laboratory Standards Institute, 2019.
- Correa, M.S. et al., 2019. Antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil from dried leaves of *Eucalyptus staigeriana*. Arq. Inst. Biol, 86: 1-8, e0202018. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000202018>
- Coronado-Álvarez, N.M., Parra, D., Parra-Ruiz, J. 2019. Clinical efficacy of fosfomycin combinations against a variety of gram-positive cocci. Enferm Infecc Microbiol Clin. 37(1):4-10. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.05.009>

- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 12:564–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
- Cushnie, T.P.T., O'Driscoll, N.H., Lamb, A.J. 2016. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. *Cell Mol Life Sci.* 73(23):4471-4492. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2302-2>
- Dabaja-Younis, H. et al. 2021. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Israeli children: Community- vs hospital-acquired or healthcare related infections. *Acta Paediatr.* 110(1):210-218. <https://doi.org/10.1111/apa.15393>
- De Oliveira, D.M.P. et al. 2020. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 13;33(3):e00181-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>
- Eljaaly, K., Alshehri, S., Erstad, B.L. 2018. Systematic review and meta-analysis of the safety of antistaphylococcal penicillins compared to cefazolin. *Antimicrob Agents Chemother.* 62(4). pii: e01816-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01816-17>
- El Mekes, A. et al. 2019. The clinical and epidemiological risk factors of infections due to multi-drug resistant bacteria in an adult intensive care unit of University Hospital Center in Marrakesh-Morocco. *J Infect Public Health.* 16, pii: S1876-0341(19)30292-8. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.08.012>
- Falagas, M.E., Koletsis, P.K., Bliziotis, I.A. 2006. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*, 55(Pt 12): 1619-1629. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46747-0>
- Fam, N. et al. 2017. Antimicrobial efficacy of doripenem colistin combination on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates by E-test Agar Dilution and Ultrastructural Methods. *Egyp J Med Microbiol*, 26(1):1-7. <https://doi.org/10.12816/0046266>
- Farlow, J. et al. 2019. Comparative genomic analysis of four multidrug resistant strains of *Acinetobacter baumannii* from the country of Georgia. *J Glob Antimicrob Resist.* pii: S2213-7165(19)30294-2. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.11.002>
- Fazly Bazzaz, B.S. et al. 2016. Effect of catechins, green tea extract and methylxanthines in combination with gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: Combination therapy against resistant bacteria. *J Pharmacopuncture.* 19:312–8. <https://doi.org/10.3831/KPI.2016.19.032>

- Firmo, E.F. et al. 2020. In vitro activity of polymyxin B in combination with meropenem, amikacin and gentamicin against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates co-harboring aminoglycoside-modifying enzymes, blaNDM-1 and blaKPC-2. *J Glob Antimicrob Resist*. 22:511-514. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.04.014>
- Guo, T. et al. 2021. Synergistic activity of capsaicin and colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: In Vitro/Vivo Efficacy and Mode of Action. *Front. Pharmacol*, 12:744494. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.744494>
- Kaur, A., Sharma, P., Capalash, N. 2018. Curcumin alleviates persistence of *Acinetobacter baumannii* against colistin. *Sci Rep*. 8(1):11029. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29291-z>
- Kim, B., Kim, K., Yoon, J.S. 2020. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infection in children in adult versus pediatric intensive care units. *Pediatr Int*. 62(4):451-458. <https://doi.org/10.1111/ped.14133>
- Klepser, M.E. 1998. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 42(5):1207-1212. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.5.1207>.
- Kurihara, M.N.L. et al. 2020. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreaks: a global problem in healthcare settings. *Rev Soc Bras Med Trop*. 53:(e20200248). <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0248-2020>
- Kwa, A. et al. 2007. Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). *Expert Rev. Anti. Infect. Ther*. 5, 811-821. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.5.811>
- Lee, W.X., Basri, D.F., Ghazali, A.R. 2017. Bactericidal effect of pterostilbene alone and in combination with gentamicin against human pathogenic bacteria. *Molecules*. 17;22(3). <https://doi.org/10.3390/molecules22030463>
- Lima, F.C.G. et al. 2020. Ultrastructural changes caused by the combination of intravenous immunoglobulin with meropenem, amikacin and colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Pathog*, 149: 104437. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104437>
- Liu, X. et al. 2016. Synergistic killing by meropenem and colistin combination of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Chinese patients in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Inter J Antimicrob Agents*, 48(5):559-563. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.07.018>

- Malafaia, C.B. et al. 2018. Effects of Caatinga plant extracts in planktonic growth and biofilm formation in *Ralstonia solanacearum*. *Microb Ecol*, 75:555–561. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1073-0>
- Marchese, A. et al. 2018. The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. *Biofouling*. 34(6):630-656. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1480756>
- Marques, C. A. 2001. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambient*. 8(1), 195-206.
- Moellering, R. C. Jr. 1983. Rationale for use of antimicrobial combinations. *Am. J. Med*. 75, 4-8. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(83\)90088-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(83)90088-8)
- Moussaoui, F., Alaoui, T. 2016. Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*, 6(1): 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.024>
- Nation, R.L., Li. J. 2009. Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis*. 22(6):535-43. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328332e672>
- Odds, F.C. 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 52(1):1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
- Olaitan, A.O., Morand, S., Rolain, J.M. 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol*. 5, 643. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
- Oliveira Júnior, J.B. et al. 2020. Antimicrobial activity and biofilm inhibition of riparins I, II and III and ultrastructural changes in multidrug-resistant bacteria of medical importance. *Microb Pathog*, 149: 104529. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104529>
- Palomino, J. C. et al. 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(8): 2720-2722. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>
- Park, G.C. et al. 2016. In vitro interactions of antibiotic combinations of colistin, tigecycline, and doripenem against extensively drug-resistant and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Lab Med*. 36(2):124-30. <https://doi.org/10.3343/alm.2016.36.2.124>

- Perez, S. et al. 2020. Increase in hospital-acquired carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection and colonization in an acute care hospital during a surge in COVID-19 admissions - New Jersey, February-July 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 4;69(48):1827-1831. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6948e1>
- Rangel, K., Chagas, T.P.G., De-Simone, S.G. 2021. *Acinetobacter baumannii* infections in times of COVID-19 pandemic. *Pathogens*, 10(8): 1006. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081006>
- Roberts, K.D. et al. 2015. Antimicrobial activity and toxicity of the major lipopeptide components of polymyxin b and colistin: last-line antibiotics against multidrug-resistant gram-negative bacteria. *ACS Infect Dis*. 1(11):568-575. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00085>
- Rutter, W.C., Burgess, D.S. 2018. Incidence of acute kidney injury among patients treated with piperacillin-tazobactam or meropenem in combination with vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 62(7). pii: e00264-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00264-18>
- Sanhueza, L. et al. 2017. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS One*. 12(2):e0172273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172273>
- Silva, D.M., Costa, P.A., Ribon, A.O.B., Purgato, G.A., Gaspar, D.M., Diaz, M.A.N., 2019. Plant extracts display synergism with different classes of antibiotics. *An. Acad. Bras. Cienc*. 91 (2), e20180117 <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180117>.
- Song, M. et al. 2021. Plant Natural Flavonoids Against Multidrug Resistant Pathogens. *Adv. Sci*. 8: 2100749. <https://doi.org/10.1002/advs.202100749>
- Stepanović, S. et al. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 40(2): 175-179. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6)
- Subramani, R., Narayanasamy, M., Feussner, K.D. 2017. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. *3 Biotech*. 7(3):172.
- Silva, D.M. et al. 2019. Plant extracts display synergism with different classes of antibiotics. *An Acad Bras Cienc*. 91(2): e20180117. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0848-9>

- Sulieman, A.M.E. et al. 2017. Evaluation of antimicrobial and synergistic effects of selected medicinal plants of Hail area with antibiotics. *Biosci. Biotech. Res. Comm.* 10(1): 44-50. <http://dx.doi.org/10.21786/bbrc/10.1/7>
- Tang, H.J. et al. 2017. Cephalosporin-glycopeptide combinations for use against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates: enhanced in vitro antibacterial activity. *Front Microbiol.* 8:884. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00884>
- Torres, C.A. et al. 2016. Antibacterial synergism of extracts from climbers belonging to Bignoniaceae family and commercial antibiotics against multi-resistant bacteria. *J Herbal Medicine.* 8, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.02.002>
- Tuon, F.F., Rocha, J.L., Merlini, A.B. 2015. Combined therapy for multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection - is there evidence outside the laboratory? *J Med Microbiol.* 64(9):951-9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000144>
- Tyers, M., Wright, G.D. 2019. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. *Nat Rev Microbiol.* 17(3):141-155. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0141-x>
- van Duin, D., Paterson D.L. 2016. Multidrug-resistant bacteria in the community: trends and lessons learned. *Infect Dis Clin North Am.* 30(2):377-390. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>
- Wang, Y. et al. 2019. In vitro and in vivo assessment of the antibacterial activity of colistin alone and/or in combination with other antibiotics against *A. baumannii* and *E. coli*. *J Glob Antimicrob Resist.* 23. pii: S2213-7165(19)30246-2. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.013>
- Wentao, N. et al. 2018. In vitro activity of minocycline combined with aminoglycosides against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *J Antibiot (Tokyo).* 71(5):506-513. <https://doi.org/10.1038/s41429-017-0024-9>
- WHO, World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. Available in: <https://www.aiddatahub.org/sites/default/files/resource/who-global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria.pdf> Access in: 25 dez. 2019.
- Wongsurakiat, P., Chitwarakorn, N. 2019. Severe community-acquired pneumonia in general medical wards: outcomes and impact of initial antibiotic selection. *BMC Pulmonary Medicine.* 19(1):179. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-0944-1>

- Wright, G.D. 2017. Opportunities for natural products in 21(st) century antibiotic discovery. *Nat. Prod. Rep.* 34, 694–701. <https://doi.org/10.1039/c7np00019g>
- Zhou, Y. et al. 2018. Pterostilbene, a potential MCR-1 inhibitor that enhances the efficacy of Polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 62(4). pii: e02146-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02146-17>
- Zhu, W. et al. 2018. In vitro evaluation of antimicrobial combinations against imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of different MICs. *J Infect Public Health.* 11(6):856-860. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.07.006>
- Zuniga-Moya, J.C. et al. 2020. Antimicrobial profile of *Acinetobacter baumannii* at a tertiary hospital in Honduras: a cross-sectional analysis. *Rev Panam Salud Publica*, 44:e46. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.46>

**APÊNDICE B - ARTIGO 2: IN VITRO INHIBITION AND ERADICATION OF
MULTIDRUG-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII BIOFILMS BY
RIPARIN III AND COLISTIN COMBINATION**

Submitted to Journal Microbial Pathogenesis. **Impact Factor:** 3.848. **Qualis:** A3.

Jorge Belém Oliveira Júnior^{1*}, Daivyane Aline Rocha da Mota¹, Fernanda Cristina Santos de Lima², Taciana Mirely Maciel Higino³, Stanley Juan Chavez Gutierrez⁴, Celso Amorim Camara⁵, José Maria Barbosa-Filho⁶, Luiz Carlos Alves^{1,7}, Fábio André Brayner^{1,7}.

¹Laboratory of Molecular and Cellular Biology, and Laboratory of Leishmaniasis and Mutagenesis, Department of Parasitology, Aggeu Magalhães Institute (FIOCRUZ/PE), Recife/Pernambuco/Brazil.

²Central Laboratory of Public Health of Pernambuco, Recife, Pernambuco/Brazil.

³Altino Ventura Foundation, Recife, Pernambuco/Brazil.

⁴Department of Pharmacy, Laboratory of Chemical Technology, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil.

⁵Department of Chemistry, Rural Federal Universidad of Pernambuco, Recife, Pernambuco/Brazil.

⁶Department of Pharmacy, Laboratory of Pharmaceutical Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

⁷Electronic Microscopy Laboratory, Keizo Asami Institute, Federal Universidad of Pernambuco, Recife/Pernambuco/Brazil.

*Corresponding author: Jorge Belém Oliveira Júnior. Mailing address: Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Department of Parasitology, Aggeu Magalhães Institute (Fiocruz/PE), Recife/Pernambuco, Brazil. Phone: +51 81 2101-2693. E-mail: juniorbiologia@hotmail.com

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii remains the major emerging pathogen widely associated with persistent and recurrent healthcare-associated infections (HAIs); in addition, bacterial resistance, and virulence factors, such as biofilm formation, contribute to the ability to survive for long periods in hospital environments. The use of antimicrobial combination therapy is an effective choice for such complications; however, factors such as antimicrobial resistance and toxicity compromise the antimicrobial action. Thus, several studies have demonstrated a synergistic effect between antimicrobials and natural products against multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* biofilm. Riparin III, which is a natural alkamide obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez., has several biological activities, including high antimicrobial potential; however, there are no reports about the use of riparin III associated with conventional antimicrobials. Thus, this study aimed to analyze the inhibition and eradication of MDR *A. baumannii* biofilms for riparin III and colistin combination, as well as possible ultrastructural changes. The riparin III/colistin combination in the synergistic concentrations exhibited a low hemolytic percentage ranging from 5.74% to 6.19%. The clinical isolates evaluated were described as strong biofilm-forming; therefore, the synergistic combination of riparin III/colistin promoted the biofilm inhibition and eradication, in addition, it was possible to observe several ultrastructural changes in the biofilm, such as elongated cells and cocci morphology, as well as partial or total destruction of the extracellular matrix of the biofilm and cells with extravasation of cytoplasmic material. Thus, the riparin III/colistin combination has a low hemolytic percentage and an inhibitory and eradicating action on the *A. baumannii* biofilm, making it possible to promote several ultrastructural changes, indicating a potential alternative for therapeutic purposes.

Keywords: Riparin III, Synergism; *Acinetobacter baumannii*, Biofilm, Electron microscopy.

INTRODUCTION

Acinetobacter calcoaceticus-*Acinetobacter baumannii* complex is a bacterial group described as the most frequent of medical importance [33,72], and *A. baumannii* emerging as an opportunistic pathogen in persistent and recurrent infections in worldwide. This rise of *A. baumannii* represent a significant threat to the public health [39,73]; moreover, this specie has been included on the list of global priority pathogens (category critical) resistant to antimicrobials [40, 66].

Usually, *A. baumannii* can colonize the skin, oropharynx, and gastrointestinal tract without causing infections [37], but in immunocompromised patients it causes several infections, such as urinary tract, surgical wounds, secondary meningitis and bloodstream [51]; however, it may also be involved in infections through contamination of hospital equipment with clonal dissemination, as well as high cost and mortality rate [16, 28, 30, 59, 69, 72].

The incidence of *A. baumannii* occur around 88% of Healthcare-Associated Infections (HAIs) [60, 74], due to antimicrobial resistance and virulence, in addition to the ability to survive in long periods of time in hospital environments, mainly catheters and respiratory equipment [36], as well as biotic surfaces or in the presence of antimicrobials and phagocytes [26, 38, 49], limiting the therapy [39]. It is important to emphasize that this ability is a factor uncommon among other Gram-negative pathogens [35, 64].

Generally, this adaptation of *A. baumannii* implicate in the development of biofilms. Previous studies describe that 45-73% of multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* were able to form biofilm and, currently, studies have been focused on their virulence and pathogenesis [22, 39, 54]. Therefore, recently there was the reintroduction of the “old generation” of antimicrobials, such as polymyxin E (or colistin) as the last line of therapy to control the growth of MDR *A. baumannii* infections [2, 17, 72]; however, there are reports of colistin-resistant strains [13, 59].

The lack of new antimicrobials for the treatment of MDR *A. baumannii* infections is promoting the search for natural products associated with antimicrobials for therapeutic purposes have been carried out. Several studies on phytomolecules have been analyzed [1, 8], such as riparin III alone [14, 15, 47] and associated with antimicrobials [48]. This main natural alkamide is obtained from the unripe and calyx

fruit of *Aniba riparia* (Nees) Mez., representing a total of 34% of the extracted compounds [9].

The traditional use of *A. riparia* (Nees) Mez. it is not registered in the literature; however, *in vitro* biological activities have been demonstrated, including antimicrobial [9, 10, 14, 15, 47, 48] and antibiofilm [46]. In study of Oliveira Júnior et al. [47], the antimicrobial activity of riparin III against MDR *S. aureus* and *A. baumannii* isolates, as well as high potential for inhibiting biofilm formation *in vitro* in *S. aureus* was determined; furthermore, a decrease in the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of colistin associated with riparin III against MDR *A. baumannii* was observed [48].

It is relevant to emphasize the important role of cytotoxicity analysis, which is a tool that provides the potential therapeutic activity of natural compounds [50]. This technique allows verifying the ability to induce the lysis of cell membrane, in addition to being the first stage of *in vitro* assays, observing the appropriate concentrations and incubation times [12].

Many studies have confirmed *in vitro* synergistic effect of antimicrobials and natural products combinations against MDR *A. baumannii* isolates biofilms; however, there are no reports available on the use of riparin III associated with conventional antimicrobials. Thus, this study aimed to analyze the inhibition and eradication of MDR *A. baumannii* biofilms for riparin III and colistin combination, as well as possible *in vitro* ultrastructural changes.

MATERIALS AND METHODS

Obtaining riparin III

Riparin III, chemically known as (O-methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl)-tyramine or N-[8'-(4'-methoxyphenylethyl)]-2,6-dihydroxy-benzoylamide, is a natural alkamide isolated from unripe fruit of *Aniba riparia* (Ness) Mez. (Lauraceae) through by organic synthesis [9]. This compound is the main molecular component, representing a total of 34% of the extracted compounds [9], and it was stored in an appropriate container, without direct contact with light at 23 °C.

Antimicrobial agents

Riparin III was used for testing in association with polymyxin E (or colistin) Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Solutions of antimicrobial were prepared according to CLSI (2019) and stored at the temperature specified by the manufacturer.

Multidrug-resistant clinical isolates

Riparin III and colistin were tested against MDR *A. baumannii* isolates obtained from public hospitals in Recife/Pernambuco/Brazil by spontaneous demand and surveillance [48]. Its identification and determination of antimicrobial resistance profile were acquired by VITEK 2 (Biomérieux) automated system, followed by laboratory confirmation. Bacterial strains were activated with 30 μ L of the stock, added on BHI (Brain Heart Infusion) broth for microbial enrichment and incubated for 18-24 h in bacteriological oven at 36 ± 1 °C. Then, they were seeded in a BHI agar and incubated in an oven at 36 ± 1 °C for 18-24 h for cultivation and bacterial isolation. The concentration of bacterial cells (10^8 CFU/mL), adjusted to match the turbidity standard of 0.5 McFarland of MDR clinical isolates.

Hemolysis test

Hemolytic activity was availed only in the synergic concentration between riparin III and colistin [48] through the method described by Becerra et al. [11]. Riparin III and colistin were diluted in saline solution (0.85% NaCl and 10 nM CaCl_2) in 96-well microplates. Then, 2 mL of homogenized blood were dissolved in saline solution, centrifuged at 2.500 rpm for 2 min and incubated for 3 h at 36 ± 1 °C under constant shaking.

A positive control of cell lysis (1% Triton X-100 - Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) and a negative control (cells in saline solution) were added. After incubation, the microplates were centrifuged at 3.500 rpm for 4 min at 23 °C, and the supernatant was removed to another microplate to read absorbance at 540 nm (Benchmark plus, Bio-Rad®, California, EUA). The assessment was done in two independent experiments and in quadruplicate.

Biofilm formation

The biofilm was quantified using the methodologies described by Stepanović et al. [61] and Anbazhagan et al. [3] with adaptations. In 96-well microplates, 200 μ L of microbial suspensions were added, and incubated for 24 h at 36 ± 1 °C. The suspensions were removed, and the microplates were incubated for 40-60 min at 60 ± 1 °C. Then, 200 μ L of crystal violet were added for 15 min, followed by immersion washes in water. 200 μ L of absolute ethanol were added in microplates for 30 min, followed absorbance reading at 570 nm in a spectrophotometer (Benchmark plus, Bio-Rad®, California, USA). Each isolate was classified by optical density (OD) as: non-adherent ($OD_i \leq OD_c$), weakly adherent ($OD_c < OD_i < 2 \times OD_c$), moderately adherent ($2 \times OD_c < OD_i \leq 4 \times OD_c$), or strongly adherent ($4 \times OD_c < OD_i$) based on their absorbance [61].

Biofilm inhibition and eradication

Inhibition and eradication of biofilm were adapted of methodologies of Stepanović et al. [61] and Anbazhagan et al. [13]. Biofilm inhibition was realized in 96-well microplates with addition of 200 μ L of the solution of riparin III/colistin combination in sub-synergistic concentration [48], microbial suspension (10^8 CFU/mL), coverslip and 0.5 cm sterile catheter. After incubation for 24 h at 36 ± 1 °C, the coverslip and catheter were carefully removed for subsequent analysis by scanning electronic microscopy (SEM). The analyze of eradication biofilm occurred after incubation for biofilm formation (24 h at 36 ± 1 °C) submitted to riparin III/colistin combination in the sub-synergistic concentration [48], microbial suspension (10^8 CFU/mL), coverslip and 0.5 cm sterile catheter, followed by careful removal of the coverslip and catheter for analysis by SEM.

Then, the volume was removed, and crystal violet was added for 15 min and immersion washes in water. A volume of 200 μ L of absolute ethanol was added for 30 min, followed by spectrophotometry reading at 570 nm (Benchmark plus, Bio-Rad®, California, USA) and classification of each isolate according to optical density [61].

Scanning electron microscopy

MDR *A. baumannii* clinical isolates, coverslip and 0.5 cm sterile catheter were exposed to sub-MIC for 18 h [48], which were washed in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for attachment to Karnovisk (0.1 M phosphate buffer and 2.5% glutaraldehyde)

(Sigma-Aldrich). Post-fixation was performed with 1% osmium tetroxide (Electron Microscopy Science) in 0.1 M phosphate buffer for 90 min. They were then washed in 0.1 M phosphate buffer for dehydration used ethanol (Sigma-Aldrich). After, critical point and assembly in metal stubs were realized using a double carbon tape, metallization, and viewing of the bacterial cells under a scanning electron microscope (JEOL JSM-5600 LV) [47].

Statistical analysis

Hemolytic percentage and *A. baumannii* biofilm were determined by linear regression using the SPSS 18.0 software (IBM Co., New York, USA). The analysis of significance of biofilm inhibition and eradication was described by ANOVA test.

RESULTS AND DISCUSSION

Natural products are considered a source for the development of new natural or synthetic drugs, and their use for therapeutic purposes is quite old [20, 42, 67]. The credibility of the derived source accentuates the occurrence of non-existence or restriction of natural products with antimicrobial action [20, 62]; however, the recurrent identification of MDR bacteria involved in HAIs is one of the main reasons to reinvestigate natural products with antimicrobial action, due to the relatively limited shelf life of antimicrobials [43].

It is known that HAIs remain one of the main global health concerns with significant impact on morbimortality, quality of life of patients and the high cost in health systems in worldwide [4, 52, 65]. In this study, MDR *A. baumannii* clinical isolates were analyzed, which is an opportunistic pathogen associated with infections mainly related to indwelling catheters and burn wound [39]. This bacterial specie accumulates several resistance mechanisms, making it a multidrug-, extensive-drug or pan-drug-resistant specie, in addition to ability to develop biofilm [26, 27, 36], which plays an important role in antimicrobial resistance and virulence [19].

Several countries have been using natural products as a therapeutic alternative for infections [6, 25, 63]. It is important to emphasize that the use plant-based products are among the alternative agents examined to replace conventional and synthetic antimicrobials [31, 34]; moreover, the activity of these products is a promising, since

they make up more than 75% of all antimicrobials currently used against bacterial infections [23].

The combination therapy use of antimicrobials for treatment of *A. baumannii* infections is safe [41, 57]; however, some factors as antimicrobial resistance [29], antimicrobials antagonism [28] or antimicrobial toxicity [7, 53, 55] may compromise the effectiveness of the treatment.

It is important to emphasize that, mostly, phytomolecules monotherapy should not be used, because to the high effective MIC against microorganisms, compared to antimicrobials; for this reason, the effects of antimicrobials and phytomolecules combinations have been studied.

Studies with natural products alone or in combination should analyze the cytotoxicity related to membrane disruption or the ability to induce lysis of erythrocytes [50]. Through this analysis it is possible to determine the potential therapeutic activity of natural compounds [50]. According to Nofiani et al. [44], the hemolytic action should be considered high when it is greater than 40% and low when this value is less than 10%. Yamaguchi & Veiga-Junior [68] observed a low hemolytic activity (1.22 - 625 µg/mL) in essential oils of *Endlicheria citriodorapela* (Lauraceae). In this study, the hemolytic action of riparin III alone and in combination with colistin was evaluated at synergistic concentration. Alone, riparin III exhibited a low hemolytic percentage (9.35%; SD 1.06) and colistin (1.85%; SD 1.20). Regarding the synergistic combination between riparin III/colistin (25 µg/mL / 1 µg/mL) for *A. baumannii* (isolate 54) and riparin III/colistin (50 µg/mL / 0.25 µg/mL) for *A. baumannii* (isolate 808), both exhibited a percentage of 6.19% (SD 1.31) and 5.74% (SD 0.97), respectively; moreover, Oliveira et al. [46] confirm that the natural compound presenting a high cytotoxic concentration *in vitro*, this does not guarantee similar data *in vivo*.

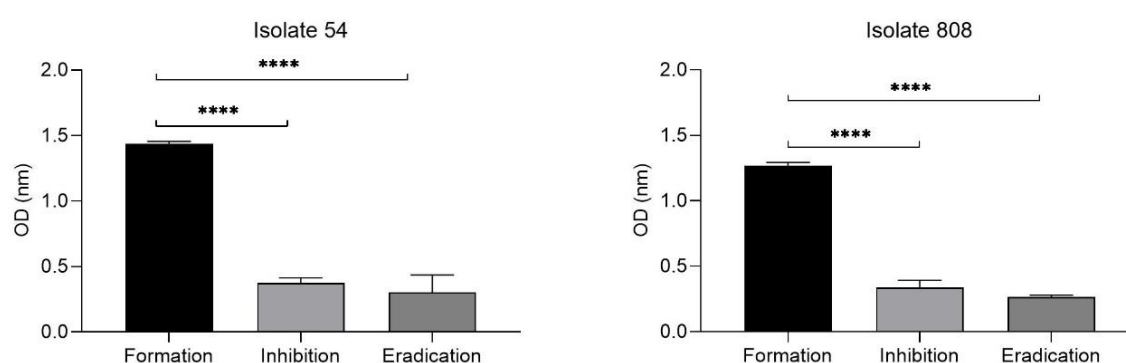
In our analysis, the low hemolytic percentage of the combination of riparin III and colistin suggests that it does not cause severe damage to human erythrocyte membranes. Thus, the stability of the erythrocyte membrane is a reference to observe the absence of damage caused by compounds in cytotoxicity screenings [58], as well as ability to break the cell membrane of erythrocytes, through the analysis of adequate concentrations and incubation times must be analyzed *in vitro* [12].

There is recurring identification of colistin-resistant *A. baumannii* and biofilm formation [24], which is an antimicrobial of the last line for treatment of MDR *A.*

baumannii. So, the use of the synergistic combination between antimicrobial and natural product is being contemplated as a new alternative therapeutic approach [48].

The MDR *A. baumannii* isolates were evaluated for *in vitro* biofilm formation through the analysis of the optical densities of the isolates (OD_i) compared to the optical densities of the controls (OD_c). Initially, it was observed that both isolates of *A. baumannii* (54 and 808) were classified as strong biofilm-forming ($4 \times \text{OD}_c < \text{OD}_i$). Through the synergistic combination of riparin III/colistin (25 µg/mL / 1 µg/mL) for *A. baumannii* (isolate 54) and riparin III/colistin (50 µg/mL / 0.25 µg/mL) for *A. baumannii* (isolate 808), there was significant inhibition and eradication of *A. baumannii* biofilm, subsequently classified as moderate and weak biofilm-forming (Figure 1).

Figure 1 - Biofilm formation, inhibition, and eradication of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* (54 and 808 isolates) submitted to riparin III/colistin combination.



Legend: The difference among means was analyzed by ANOVA test. Values **** differ significantly among experimental conditions ($p < 0.0001$). OD (nm), Optical Density (nanometers).

Several studies confirm that the use of natural products in combination with conventional antimicrobials can change the sensitivity profile and decrease the dose necessary for therapeutic efficacy, in addition to exhibiting antibiofilm action [5, 32, 45, 48, 56].

Maipomycin A (MaiA), which is isolated from the metabolites of a rare actinomycete strain *Kibdelosporangium phytohabitans* XY-R10, was analyzed. The

authors observed that MaiA has synergistic effect to enhance colistin efficacy against *A. baumannii*, indicating that MaiA may potentially serve as an effective antibiofilm agent to prevent Gram-negative biofilm formation [70]. Chrysin, a component of honey with anti-inflammatory and antioxidant properties, was evaluated the antimicrobial activity of chrysin/colistin combination against *A. baumannii* both *in vitro* and *in vivo*. The results revealed that chrysin/colistin combination demonstrated an inhibitory effect on biofilm formation [71].

A previous study observed that riparin III has action against the *S. aureus* biofilm; however, it induced biofilm formation of *A. baumannii* [47]. Although, our study confirms that the riparin III/colistin combination can potentiate the eradicating activity, as well as inhibit the formation of the MDR *A. baumannii* biofilm, inferring that this combination can prevent the adherence of the biofilm to the surface or promote the destruction of the formed biofilm.

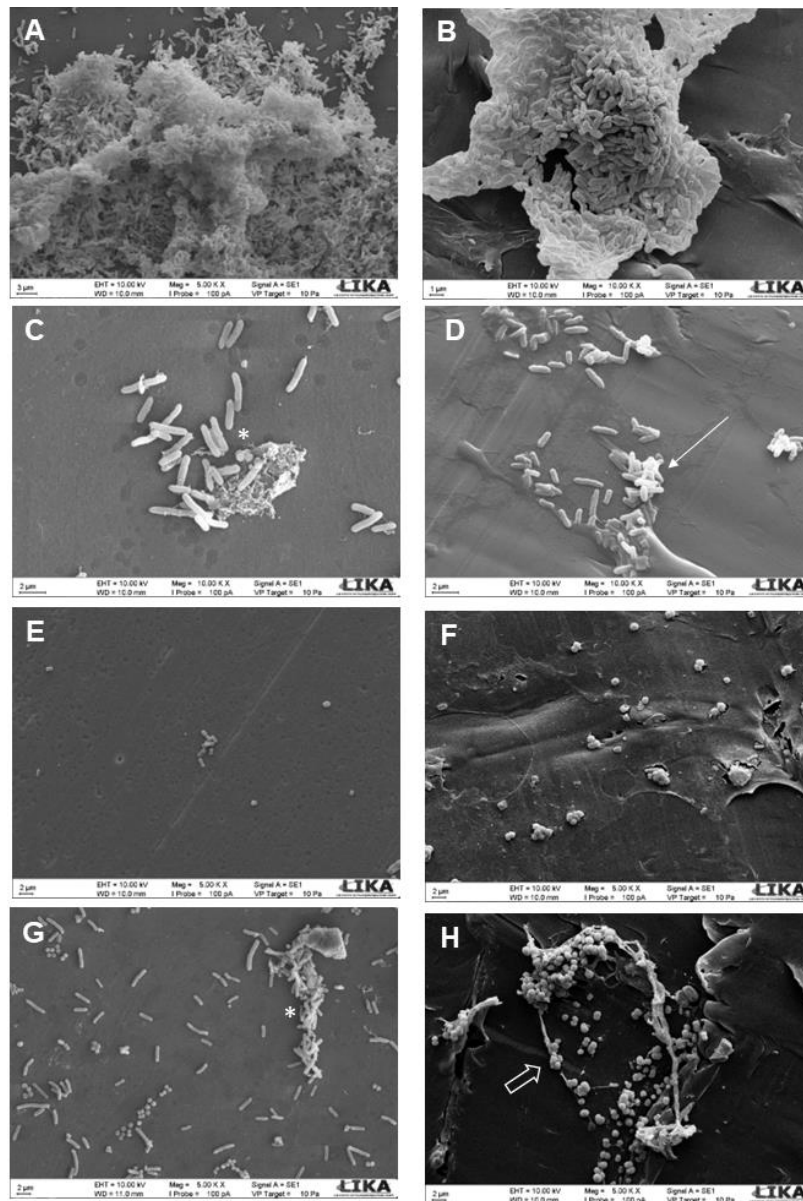
Another very important role is the combination of natural product and antimicrobial, such as colistin, which can cause ultrastructural changes. Cushnie; O'Driscoll; Lamb [21] performed a comprehensive review on the main morphological changes observed in bacterial cells induced by antiseptics, disinfectants, and antibacterial drugs. According to the authors, among the main changes are: spheroplast (cells that have lost their peptidoglycan layer), ovoid cells, filamentation, pseudomulticellular bacteria (cell with multiple septa) or septal disruption, swelling, altered cell size, bulge formation, protrusions, peptidoglycan thickening, separation of cell envelope layers, intracellular vacuoles, among others. Our results corroborate these data.

SEM of *A. baumannii* (isolate 54) demonstrated control cells with intact surface, coccobacillus morphology and adhered to the surface with biofilm formation. Bacterial cells submitted to riparin III (25 µg/mL) showed cells with elongation and absence of bacterial septum, in addition to cell adhesion with apparent formation of extracellular matrix. Bacterial submitted to colistin (1 µg/mL), there was a reduction in the number of adhered bacterial cells, as well as morphological alteration. Exposure of bacterial cells to the combination of riparin III/ colistin (25 µg/mL / 1 µg/mL) caused absence of the biofilm and the presence of elongated cells and greatly altered morphology - cocci shape, as well as destruction of the extracellular matrix of the biofilm, with some cells leaking cytoplasmic material (Figure 2).

Regarding the SEM of *A. baumannii* (isolate 808), the control cells exhibited biofilm formation, of which it was possible to verify the integrity of the morphology and surface. Cells exposed to riparin III (50 µg/mL) showed morphology of agglomerated cocci with absence of extracellular matrix, and bacterial cells exposed to colistin (0.25 µg/mL), a reduction in the number of bacterial cells and morphological changes were observed, such as elongated cells with a rough surface. Bacterial cells submitted to riparin III/colistin (50 µg/mL / 0.25 µg/mL) combination were not able to form the biofilm, and it is possible to observe the morphology change (coccus-shaped and elongated cells), in addition to the absence of matrix extracellular (Figure 3).

In another study, the authors observed that the riparin III/colistin combination promotes ultrastructural changes in *A. baumannii*, such as reduction in the cell number, rough appearance, in addition to indefinite morphologies and total defragmentation of the bacterial cell wall [48].

Figure 2 - Ultrastructural changes by riparin III/colistin combination against multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* biofilm (isolate 54).

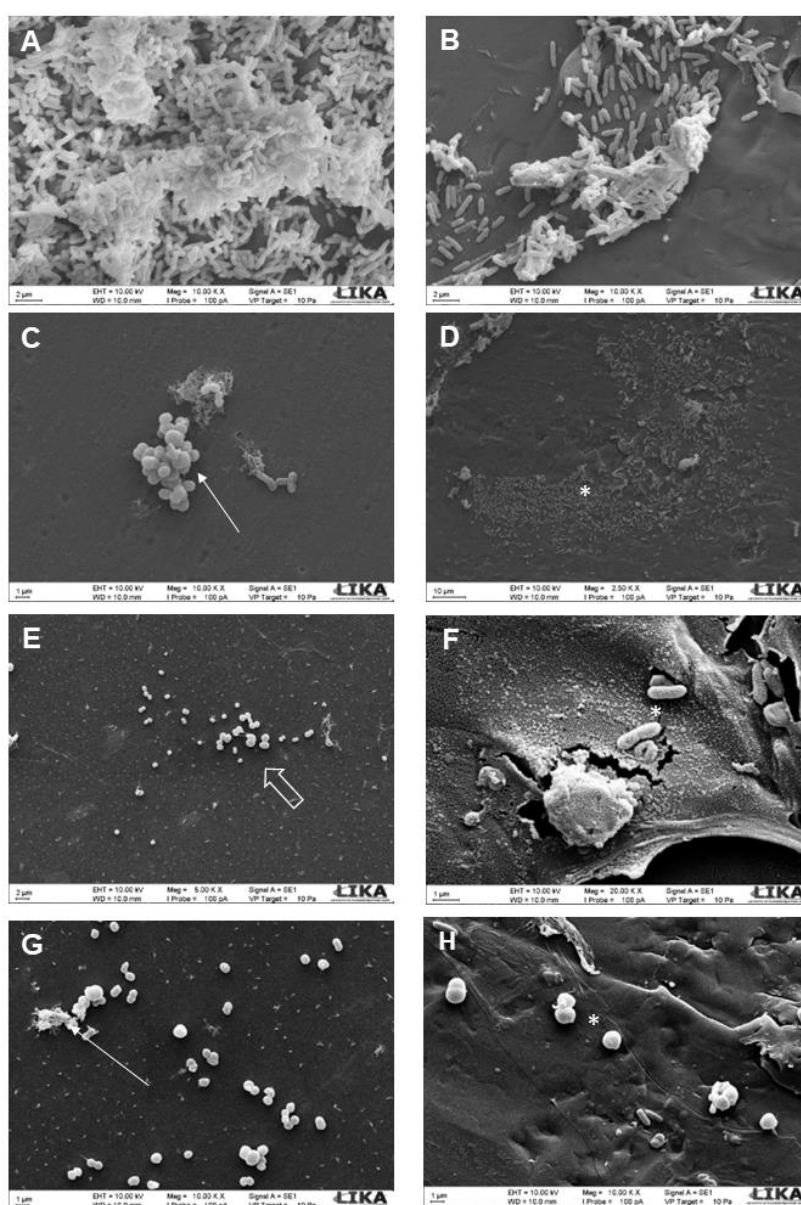


Electron micrographs of *Acinetobacter baumannii*, isolate 54. **A** and **B** - Bacterial cells (control) showing intact surface and coccobacillus morphology. Note clusters of cells adhered to the surface of the catheter with biofilm formation. **C** and **D** - Bacterial cells submitted to riparin III (25 µg/mL): observe cell elongation without the presence of bacterial septum (asterisk) and cell adhesion with apparent formation of extracellular matrix (arrow). **E** and **F** - Bacterial cells exposed to colistin (1 µg/mL): observe a reduction in the number of adhered bacterial cells, showing changes in cell size and shape. **G** and **H** - Bacterial cells exposed to riparin III/colistin (25 µg/mL / 1 µg/mL) combination: observe the absence of biofilm and the presence of elongated cells (asterisk) and spherical-shaped bacteria (arrow), in addition to the destruction of the extracellular matrix of the biofilm, some cells show extravasation of cytoplasmic material.

Our data corroborate previous studies, as the riparin III/colistin combination caused ultrastructural changes in the *A. baumannii* biofilm or prevented its formation on the catheter surface. This is the first report indicating riparin III/colistin combination

exhibit low hemolytic percentual and it can significantly cause the inhibition and eradication of biofilm *A. baumannii* MDR, in addition to demonstrate the ability to generating ultrastructural change.

Figure 3 - Scanning electron microscopy of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* (isolate 808) biofilm submitted to riparin III/colistin combination.



Electron micrographs of *Acinetobacter baumannii*, isolate 808. **A** and **B** - Bacterial cells (control) showing biofilm formation. Note cells with intact morphology and surface, forming a cluster of cells adhered to catheter surface with production of extracellular matrix. **C** and **D** - Bacterial cells exposed to riparin III (50 µg/mL): note some cells in the form of agglomerated cocci (long arrow) and bacterial cells adhere to the catheter surface without the presence of extracellular matrix (asterisk). **E** and **F** - Bacterial cells exposed to colistin (0.25 µg/mL): observe a reduction in the number of bacterial and poorly adhered cells, demonstrated ultrastructural changes in cell size and shape, such as elongated cells with a rough surface (asterisk). **G** and **H** - Bacterial cells submitted to the riparin III/colistin (50 µg/mL / 0.25 µg/mL)

combination: note the absence of biofilm and the presence of spherical-shaped bacteria (long arrow), some elongated cells (asterisk).

CONCLUSION

The synergistic effect should allow the use of a lower concentration of an antimicrobial for the treatment of infections. This was determined in this study through the riparin III/colistin combination that exhibited has a low hemolytic percentage and an inhibitory and eradicating action on the *A. baumannii* biofilm, making it possible to promote several ultrastructural changes, such as cell elongation and destruction of the extracellular matrix of the biofilm. Thus, it can be inferred that this combination therapy (riparin III/colistin) may provide a new therapeutic option for controlling MDR *A. baumannii* infections.

ACKNOWLEDGMENT

Thanks to Dr. Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves for analyzing the bacterial samples by Scanning Electron Microscopy. To the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support. This work was developed at the Aggeu Magalhães Institute (FIOCRUZ/Pernambuco/Brazil) and Keizo Asami Institute (Federal University of Pernambuco/Brazil).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. ALEKSIC, V.; KNEZEVIC, P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. **Review Microbiol Res** 169(4):240-254, 2014.
2. AL-KADMY, I. M. S. et al. Prevalence of genes involved in colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*: first report from Iraq. **Microb Drug Resist** 26(6):616-622, 2020.

3. ANBAZHAGAN D. et al. Detection of quorum sensing signal molecules and identification of an autoinducer synthase gene among biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter* spp. **PLoS One**, 7(7): e36696, 2012.
4. ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infect Drug Resist** 11:1645-1658, 2018.
5. AYZAZ, M., et al. Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: potential strategy to counteract drug resistance. **Chem Biol Interact** 308, 294-303. 2019.
6. BAKAL, S. N., BERESWILL, S., HEIMESAAT, M. M. Finding Novel Antibiotic Substances from Medicinal Plants - Antimicrobial Properties of *Nigella Sativa* Directed against Multidrug-resistant Bacteria. **Eur J Microbiol Immunol** 7(1): 92-98, 2017.
7. BALOCH, Z. Q. et al. Ciprofloxacin-induced hepatotoxicity in a healthy young adult. **Cureus** 9(2): e1016, 2017.
8. BANDEIRA JUNIOR, G. et al. Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria. **J Appl Microbiol** 125(3):655-665, 2018.
9. BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Benzoyl esters and amides, stryrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochem** 26(9):2615-2617, 1987.
10. BARBOSA, R. C. S. B. C. et al. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amaz**, 8(1/2):91-4, 1988. Suplemento.
11. BECERRA, M. C. et al. In vitro activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and trypomastigote forms. **Exp Parasitol** 131(1):57-62, 2012.
12. BUNEL, V. et al. Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: State of the art, strengths, and limits. **Planta Med** 80(14):1210-1226. 2014.
13. CAI, Y. et al. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms, and antimicrobial strategies. **J Antimicrob Chemother** 67(7):1607-1615. 2012.
14. CATÃO, R. M. R. et al. Evaluation of the antimicrobial activity about multiresistents samples of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Rev Bras An Clín**, 37(4):247-9, 2005.

15. _____. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras An Clín** 42(1):9-14, 2010.
16. CHEN, C. H. al. Clonal spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* across a community hospital and its affiliated long-term care facilities: a cross sectional study. **J Microbiol Immunol Infect** 51(3): 377-384. 2018.
17. CHOU, C. C. et al. Recommendations and guidelines for the treatment of pneumonia in Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect** 52(1):172-199, 2019.
18. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 29^a ed. CLSI suplemento M100. Wayne PA: Clinical & Laboratory Standards Institute, 2019.
19. COLQUHOUN, J. M.; RATHER, P. N. Insights into mechanisms of biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* and implications for uropathogenesis. **Front Cell Infect Microbiol** 10, 253. 2020.
20. COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev** 12:564-582, 1999.
21. CUSHNIE, T. P. T.; O'DRISCOLL, N. H.; LAMB, A. J. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. **Cell Mol Life Sci** 73(23):4471-4492, 2016.
22. DI DOMENICO, E. G. et al. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. **Int J Mol Sci**, 18:1077, 2017.
23. DURAND, G. A., RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods, and perspectives. **Int J Antimicrob Agents** 53, 371-382, 2019.
24. ELHAM, B.; FAWZIA, A. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from critically ill patients: clinical characteristics, antimicrobial susceptibility, and outcome. **Afr Health Sci** 19(3):2400-2406, 2019.
25. ELISHA, I. L. et al. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. **BMC Complement Altern Med** 17(1):133, 2017.
26. ERIKSSON, S. et al. Antibacterial and anti-biofilm effects of sodium hypochlorite against *Staphylococcus aureus* isolates derived from patients with atopic dermatitis. **Br J Dermatol** 177(2):513-521, 2017.

- 27.EZE, E. C.; CHENIA, H. Y.; EL ZOWALATY, M. E. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **Infect Drug Resist** 11:2277-2299, 2018.
- 28.FAM, N. et al. Antimicrobial efficacy of doripenem colistin combination on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates by E-test agar dilution and ultrastructural methods. **Egypt J Med Microbiol** 26(1): 1-7, 2017.
- 29.GALES, A. C. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). **Open Forum Infect Dis** 6(Suppl 1): S34-S46, 2019.
- 30.GISKE, C. G. et al. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. **Antimicrob Agents Chemother** 52(3): 813-821. 2008.
- 31.HARIKRISHNAN, R.; NISHA, R. M.; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquac** 221(1-4): 41-50, 2003.
- 32.HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A.K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Int. J. Phytomedicine**, 15, 639-652, 2008.
- 33.HSIEH, W. S.; WU, H. H. Types and Prevalence of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex in Northern Taiwan. **Antimicrob Agents Chemother** 58, 201-204, 2014.
- 34.IMMANUEL, G. et al. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth, and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. **Aquac** 236 (1-4), 53-65, 2004.
- 35.KYRIAKIDIS, I. et al. A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. **Pathogens** 10(3):373, 2021.
- 36.MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. Antimicrobial resistance: *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clin Infect Dis** 46(8):1254-1263, 2008.
- 37.MACEDO, A. J.; ABRAHAM, W. R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Med Chem** 5 (6), 517-528, 2009.

38. MEA, H. J.; YONG, P. V. C.; WONG, E. H. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence, and biofilm formation. **Microbiol Res** 247, 126722. 2021.
39. MULANI, M. S. et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Front Microbiol** 10:539, 2019.
40. NAGEEB, W. et al. In vitro antimicrobial synergy studies of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units of a tertiary care hospital in Egypt. **J Infect Public Health** 8(6):593-602, 2015.
41. NEWMAN, D. J. Predominately uncultured microbes as sources of bioactive agents. **Front Microbiol** 18(7):1832, 2016.
42. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod** 83(3):770-803, 2020.
43. NOFIANI, R.; KURNIADI, R.; ARDININGSIH, P. Antimicrobial, antioxidant, hemolytic activities, and toxicity of ethyl acetate extract from an unidentified coral associated fungus, *Aspergillus brevipes* RK06. **Indones J Cancer Chemoprevention** 2(2), 211-215, 2011.
44. OFOKANSI, K. C. et al. Evaluation of the combined antimicrobial activity of the leaf extract of *Phyllanthus muellerianus* with ciprofloxacin. **J Pharm Technol Drug Res** 2:16. 2013.
45. OLIVEIRA, J. F. et al. et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **Eur J Med Chem** 136: 305-314, 2017.
46. OLIVEIRA JÚNIOR, J. B. et al. Antimicrobial activity and biofilm inhibition of riparins I, II and III and ultrastructural changes in multidrug-resistant bacteria of medical importance. **Microb Pathog** 149: 104529, 2020.
47. _____. In vitro activity of riparin III in combination with antimicrobials against multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine Plus**,100414, 2023.
48. OTTO, C. C. et al. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Ann Clin Microbiol Antimicrob** 9: 26, 2010.

49. PAILARD, F. et al. Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new entities. **Toxicol. in vitro** 13, 693-700, 1999.
50. PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Review Clin Microbiol Rev** 21(3):538-582. 2008.
51. PURO, V. et al. Pillars for prevention and control of healthcare-associated infections: an Italian expert opinion statement. **Antimicrob Resist Infect Control** 11(1):87, 2022.
52. ROBERTS, K. D. et al. Antimicrobial activity and toxicity of the major lipopeptide components of polymyxin b and colistin: last-line antibiotics against multidrug-resistant gram-negative bacteria. **ACS Infect Dis** 1(11):568-575, 2015.
53. RODRÍGUEZ-BANO, J. et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: Associated features and clinical implications. **Clin Microbiol Infect** 14(3):276-278, 2008.
54. RUTTER, W. C.; BURGESS, D. S. Incidence of acute kidney injury among patients treated with piperacillin-tazobactam or meropenem in combination with vancomycin. **Antimicrob Agents Chemother** 62(7). pii: e00264-18. 2018.
55. SABO, V. A. et al. Anti-*Acinetobacter baumannii* activity of selected phytochemicals alone, in binary combinations and in combinations with conventional antibiotics. **Nat Prod Res** 35(24):5964-5967, 2020.
56. SERTCELIK, A. et al. Synergistic activities of colistin combinations with meropenem, sulbactam, minocycline, disodium fosfomycin, or vancomycin against different clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. **Microb Drug Resist** 26(5):429-433, 2020.
57. SHARMA, P.; SHARMA, J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **J Ethnopharmacol** 74(3): 239-243, 2001
58. SNYMAN, Y. et al. Clonal expansion of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Cape Town, South Africa. **Int J Infect Dis** 91:94-100, 2020.
59. SPELLBERG, B.; REX, J. H. The value of single-pathogen antibacterial agents. **Nat Rev Drug Discov** 12(12):963, 2013.
60. STEPANOVIĆ, S. et al. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**, 40(2): 175-179, 2000.

61. SUBRAMANI, R.; NARAYANASAMY, M.; FEUSSNER, K. D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. **3 Biotech** 7(3):172, 2017.
62. van VUUREN, S.; HOLL, D. Antimicrobial natural product research: a review from a South African perspective for the years 2009-2016. **J Ethnopharmacol** 17(208):236-252, 2017.
63. WHO, World Health Organization. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report. Geneva: WHO; 2021. Available in: <https://www.amr-insights.eu/global-antimicrobial-resistance-and-use-surveillance-system-glass-report-2021/>. Access in: 25 fev 2022.
64. WHO, World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. 2017. Available in: <https://www.aidsdatahub.org/sites/default/files/resource/who-global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria.pdf> Access in: 25 fev. 2020.
65. WHO, World Health Organization. Programme on Traditional Medicine. (1998). **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review**. Geneva: WHO; 1998. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63801> Access in: 25 mar. 2020.
66. YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma Lauraceae rica em geranato de metila. **Quim Nova** 36(6): 826-830, 2013.
67. YOUNG, L. S.; SABEL, A. L.; PRICE, C. S. Epidemiologic, clinical, and economic evaluation of an outbreak of clonal multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in a surgical intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol** 28(11):1247-1254. 2007.
68. ZHANG, J. et al. Maipomycin A, a novel natural compound with promising anti-biofilm activity against Gram-negative pathogenic bacteria. **Front. Microbiol** 11:598024, 2021.
69. ZHAO, Y. et al. In vitro and in vivo synergistic effect of chrysin in combination with colistin against *Acinetobacter baumannii*. **Front Microbiol** 13:961498, 2022.
70. ZHENG, J. Y. et al. Colistin for pneumonia involving multidrug-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **J Microbiol, Immunol Infect** 53(6):854-865, 2020.

71. ZHU, Y.; HUANG, W. E.; YANG, Q. Clinical Perspective of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **Infect Drug Resist** 15:735-746, 2022.
72. ZILBERBERG, M. D. et al. Multidrug-resistance, inappropriate empiric therapy, and hospital mortality in *Acinetobacter baumannii* pneumonia and sepsis. **Critical Care** 20(1): 221. 2016.

**APÊNDICE C - IN VITRO INHIBITION AND ERADICATION OF MULTIDRUG-
RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII BIOFILMS BY RIPARIN III AND
COLISTIN COMBINATION.**

ESPÉCIES BACTERIANAS	ISOLADOS	AMOSTRAS BIOLÓGICAS	HOSPITAIS	SETORES	RESISTÊNCIA
<i>A. baumannii</i>	54	Ponta de cateter	A	UTI	AMI, AMP, CAZ, CIP, COL, CPM, CRO, GEN, IPM, MPM
<i>A. baumannii</i>	808	Líquor	B	UTI	AMP, CAZ, CIP, CPM, CRO, CRX, CRX/A, GEN, IPM, MPM
<i>S. aureus</i>	170	Hemocultura	A	ENF	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN
<i>S. aureus</i>	382	Ponta de cateter	B	ENF	CIP, CLI, ERI, MOX, NOR, OXA, PEN

Legenda: A, hospital 1; B, hospital 2; ENF, Enfermaria; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; AMI, Amicacina; AMP, Ampicilina; CAZ, Ceftazidima; CIP, Ciprofloxacina; CLI, Clindamicina; COL, Colistina; CPM, Cefepime; CRO, Ceftriaxona; CRX, Cefuroxima; CRX/A, Cefuroxima/Axetil; ERI, Eritromicina; GEN, Gentamicina; IPM, Imipenem; MOX, Moxifloxacina; MPM, Meropenem; NOR, Norfloxacina; OXA, Oxacilina; PEN, Benzilpenicilina.