

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

INGRID VIANEZ PEREGRINO

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPLEXOS
METÁLICOS CU-FENDIONA E AG-FENDIONA EM CEPAS CLÍNICAS DE
Acinetobacter baumannii RESISTENTES A CARBAPENÊMICOS

VITÓRIA, ES
2024

INGRID VIANEZ PEREGRINO

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPLEXOS
METÁLICOS CU-FENDIONA E AG-FENDIONA EM CEPAS CLÍNICAS DE
Acinetobacter baumannii RESISTENTES A CARBAPENÊMICOS

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
em Doenças Infecciosas da Universidade Federal
do Espírito Santo, como requisito para a obtenção
do título de Doutora em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Ferreira Nunes
Coorientador: Prof. Dr. André Luís Souza dos
Santos.

VITÓRIA, ES

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus: Aquele que guia os meus caminhos e segura a minha mão durante todo o percurso. E antes de agradecer a qualquer pessoa, agradeço novamente a Deus, por ter colocado em meu caminho cada uma delas.

Assim, agradeço a toda a minha família por tanto amor. Especialmente aos meus pais, ao meu marido, à minha madrinha, aos meus irmãos e sobrinhas por serem, depois de Deus, minha maior fonte de força e ânimo, para os quais eu desejo ser sempre motivo de orgulho.

Aos colegas que estiveram ao meu lado durante essa jornada, e especialmente aqueles que se tornaram meus amigos, pelos momentos compartilhados e pelo apoio emocional. A todos os colegas do RESBAC pelos momentos e conhecimentos compartilhados, e por todo auxílio durante os experimentos. Especialmente à Gabriela e ao Caio, por contribuírem ativamente com o meu trabalho, com tamanha disposição e dedicação que me faltam palavras para agradecer.

À professora Ana Paula, pela oportunidade, pela confiança e pelo comprometimento com o meu trabalho. Também pelos ensinamentos e por contribuir constantemente com a minha evolução durante todos esses anos. Obrigada por tornar tudo isso possível.

Ao professor André, também pela contribuição com a minha evolução, pela disponibilidade em me receber, sempre que possível, no LEAMER e por buscar parcerias para engrandecer meu trabalho. Obrigada por sua disponibilidade e por tornar meu trabalho infinitamente melhor. Agradeço também à Lucieri, por ter participado de forma tão solícita nos experimentos e pela companhia tão agradável nos meus dias no Fundão. Às agências financiadoras, que permitiram com que esse projeto fosse realizado: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Esforços contínuos são necessários para o desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos frente à crescente resistência a antimicrobianos. Explorar as propriedades farmacodinâmicas (PD) e o perfil de atividade de candidatos a antimicrobianos leva à otimização racional do seu desenvolvimento, alcançando o máximo potencial terapêutico e acelerando o processo de desenvolvimento. Nosso grupo de pesquisa tem investigado o potencial terapêutico de complexos metálicos derivados da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona) para o controle de patógenos críticos. Foi previamente demonstrada a eficácia da Ag-fendiona e Cu-fendiona contra cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenêmicos (CRAb) e com perfil multirresistente, tanto contra células planctônicas quanto em biofilmes. Neste estudo, caracterizamos a atividade antimicrobiana de Cu-fendiona e Ag-fendiona, determinando parâmetros PD, contra seis cepas clínicas de CRAb e a ATCC 19606. Também investigamos o potencial antivirulência desses compostos, identificando atributos e mecanismos de virulência em 26 cepas clínicas de CRAb. Ensaios de exposição-resposta revelaram fortes efeitos bactericidas em baixas concentrações, com ação predominantemente tempo-dependente, com pico de atividade entre 6-12 h. Estratégias de dosagem fracionada demonstraram eficácia antimicrobiana sustentada, com duas doses de $0,5 \times \text{CIM}$ administradas em um intervalo de 6 horas resultando em efeitos bactericidas potentes, com erradicação de todas as cepas em 24 horas. Variações nas substâncias na concentração do inóculo não influenciaram proporcionalmente os valores de CIM, confirmando a consistência da atividade bactericida em diferentes densidades bacterianas. Ambos os compostos, em uma concentração de $3,12 \mu\text{g/mL}$, erradicaram mais de 97% dos inóculos testados. Além disso, foi evidenciada a presença de efeitos pós-antibióticos (EPA) de curta duração, com a Ag-fendiona exibindo uma recuperação do crescimento mais lenta em comparação à Cu-fendiona, resultando em durações médias de EPA de 1,857 h e 0,714 h, respectivamente. O "TDtest" não revelou evidências de tolerância ou heterorresistência. A investigação dos atributos de virulência revelou uma notável heterogeneidade entre as cepas estudadas, com variações nos níveis de mucosidade, motilidade, formação de biofilme e capacidade de autoagregação. A análise das propriedades de superfície celular indicou uma correlação negativa entre os níveis de

mucosidade e a hidrofobicidade, enquanto todos os isolados apresentaram carga superficial eletronegativa. No entanto, não houve uma correlação direta entre essas características de superfície e a capacidade de formação de biofilme. No modelo de infecção por *Galleria mellonella*, foram observadas variações nas taxas de mortalidade das larvas, sugerindo uma diversidade nas estratégias patogênicas entre as cepas, porém sem uma correlação direta entre atributos de virulência e patogenicidade global. Embora estudos prévios tenham demonstrado a atividade antibiofilme desses compostos, no presente estudo, não foi possível avaliar seu impacto sobre atributos de virulência específicos devido à elevada heterogeneidade observada no grupo amostral. Assim, nossas conclusões focam no amplo potencial terapêutico de Cu-fendiona e Ag-fendiona como alternativas promissoras para o tratamento de infecções por CRAB, destacando suas propriedades antimicrobianas e perfil PD favorável frente a distintos perfis de resistência e virulência em *A. baumannii*.

Palavras-chave: Complexos Metálicos; Compostos derivados da fendiona; Propriedades farmacodinâmicas; *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos; Virulência bacteriana; *A. baumannii* biofilme.

ABSTRACT

Continuous efforts are essential for developing new anti-infective agents in response to the increasing threat of antimicrobial resistance. Exploring the pharmacodynamic (PD) properties and activity profiles of antimicrobial candidates enables rational optimization of these compounds' development, maximizing their therapeutic potential. Our research group has been investigating the therapeutic potential of metal-based complexes derived from 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione) against critical pathogens. Previous studies have demonstrated the efficacy of Ag-phendione and Cu-phendione against carbapenem-resistant (CRAB) and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains, both in planktonic cells and biofilms. In this study, we characterized the antimicrobial activity of Cu-phendione and Ag-phendione and determined their PD parameters against six clinical CRAB strains and the ATCC 19606. We also investigated the antivirulence potential of these compounds by identifying virulence attributes and pathogenic mechanisms in 26 clinical CRAB strains. Exposure-response assays revealed strong bactericidal effects at low concentrations, with predominantly time-dependent activity and peak efficacy between 6 and 12 hours. Fractionated dosing strategies showed sustained antimicrobial efficacy, with two 0.5×MIC doses administered 6 hours apart resulting in complete eradication of all strains within 24 hours. Substantial inoculum variations did not significantly alter MIC values, confirming consistent bactericidal activity across different bacterial densities. At 3.12 µg/mL, both compounds were able to eradicate over 97% of the tested inocula. Additionally, both exhibited short post-antibiotic effects (PAE), with Ag-phendione displaying slower growth recovery than Cu-phendione, with average PAE durations of 1.857 h and 0.714 h, respectively. The modified disk-diffusion ("TDtest") showed no evidence of tolerance or heteroresistance. The investigation of virulence-associated features revealed notable heterogeneity among the studied strains, with variations in levels of mucoviscosity, motility, biofilm formation, and autoaggregation capacity. The analysis of cell surface properties indicated a negative correlation between mucoidy and hydrophobicity levels, while all isolates exhibited an electronegative surface charge. However, no direct correlation was observed between these surface characteristics and biofilm formation capacity. In the *Galleria mellonella* infection model, larval mortality rates suggested diversity in pathogenic strategies among

strains, though no direct correlation was found between specific virulence attributes and overall pathogenicity. While previous studies have demonstrated the antibiofilm activity of these compounds, in the present study, the high heterogeneity of the sample group prevented the evaluation of the complexes' impact on specific virulence attributes. Thus, our conclusions focus on the broad therapeutic potential of Cu-phendione and Ag-phendione as promising alternatives for treating CRAb infections, highlighting their antimicrobial properties and favorable PD profiles across diverse resistance and virulence patterns in *A. baumannii*.

Keywords: Metal Complexes; Phendione-compounds; Pharmacodynamics; Carbapenem-resistant *A. baumannii*; Bacterial Virulence; *A. baumannii* biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de 1,10-fenantrolina, 1,10-fenantrolina-5,6-diona, [Cu(fendiona) ₃](ClO ₄) ₂ ·4H ₂ O e [Ag(fendiona) ₂]ClO ₄	22
Figura 2 -Processo de formação de Biofilme em <i>A. baumannii</i>	32
Figura 3 – Curvas de exposição-resposta produzidas pelos efeitos de Cu-fendiona em seis cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa de referência ATCC 19606.....	53
Figura 4 – Curvas de exposição-resposta produzidas pelos efeitos de Ag-fendiona em seis cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa de referência ATCC 19606.....	54
Figura 5 - Efeitos do fracionamento de doses de Cu-fendiona em seis cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa de referência ATCC 19606.....	56
Figura 6 - Efeitos do fracionamento de doses de Ag-fendiona em seis cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa de referência ATCC 19606.....	57
Figura 7 – Placa de microtitulação exemplificando leitura de teste de CIM de Cu-fendiona e Ag-fendiona em <i>A. baumannii</i> , com inóculos de 10 ⁴ a 10 ⁸ UFC/mL, utilizando corante rezasurina.....	49
Figura 8 - Efeito pós-antibiótico induzido pela exposição de 1 hora a Cu-fendiona em seis cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa de referência ATCC 19606.....	61
Figura 9 - Efeito pós-antibiótico induzido pela exposição de 1 hora a Ag-fendiona em seis cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa de referência ATCC 19606.....	62
Figura 10 – Análise do crescimento de colônias isoladas em ensaio de “TDtest” com complexos metálicos derivados da fendiona.....	64

Figura 11 - Fenótipo hipermucoide: caracterização morfológica da cepa clínica 30B.....	66
Figura 12 – Caracterização fenotípica colonial de cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> , demonstrando diversidade morfológica e de níveis de mucosidade.....	67
Figura 13 – Formação de cordões viscosos no “string test” evidenciando uma correlação não-linear com o fenótipo mucoide.....	69
Figura 14 – Avaliação quantitativa da motilidade de superfície de 26 cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa-padrão ATCC 196060.....	70
Figura 15 - Fenótipo hipermóvel em cepa clínica de <i>A. baumannii</i> evidenciando formação de estruturas ramificadas em meio semissólido.....	70
Figura 16 – Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de 26 cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa-padrão ATCC 19606.....	71
Figura 17 – Determinação do potencial Zeta em 26 cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa-padrão ATCC 19606 como estimativa da carga da superfície celular.....	72
Figura 18 - Correlação entre a hidrofobicidade da superfície e o potencial Zeta de células de <i>A. baumannii</i>	72
Figura 19 – Distribuição dos valores de hidrofobicidade da superfície celular conforme o grau de mucosidade em 26 cepas clínicas de <i>A. baumannii</i>	73
Figura 20 – Análise comparativa da formação de biofilme em poliestireno (PS) não-Coberto e PS coberto com poli-L-lisina (PLL) entre 26 cepas clínicas de <i>A. baumannii</i>	74
Figura 21 – Percentual de autoagregação de 26 cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa-padrão ATCC 19606.....	75
Figura 22 – Correlação entre a formação de biofilme e o grau de autoagregação em 26 cepas clínicas de <i>A. baumannii</i>	75

Figura 23 - Taxas de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com inóculo de <i>A. baumannii</i> em concentração de 10^5 UFC (n=13, cepas de 3B a 80B).....	76
Figura 24 - Taxas de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com inóculo de <i>A. baumannii</i> em concentração de 10^5 UFC (n=14, cepas 92B a 125B, e a ATCC 19606)	77
Figura 25 – Variações nas taxas de mortalidade de <i>G. mellonella</i> em 24h e 96h após infecção com 26 cepas clínicas de <i>A. baumannii</i>	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados da atividade antimicrobiana de Cu-fendiona e Ag-fendiona em 26 cepas clínicas de <i>A. baumannii</i>	37
Tabela 2 – Valores de concentração inibitória mínima de carbapenêmicos e complexos metálicos à base de fendiona em seis cepas clínicas de <i>A. baumannii</i>	38
Tabela 3 – Perfil de suscetibilidade às polimixinas das cepas de <i>A. baumannii</i> com resultados conclusivos por meio da microdiluição em caldo.....	51
Tabela 4 – Valores de CIM de Cu-fendiona para seis cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa-padrão ATCC 19606 com inóculos de 10^4 a 10^8 UFC/mL.....	58
Tabela 5 – Valores de CIM de Ag-fendiona para seis cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa-padrão ATCC 19606 com inóculos de 10^4 a 10^8 UFC/mL.....	59
Tabela 6 – Classificação morfológica de 26 cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> e a cepa-referência ATCC 19606 de acordo com nível de mucosidade, análise do “ <i>string test</i> ” e dimensões coloniais.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. baumannii - *Acinetobacter baumannii*

Ag-fendiona - $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$

AS – Ágar sangue

BGN – Bacilo Gram-negativo

B. subtilis - *Bacillus subtilis*

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CBM50 - Concentração Bactericida Mínima capaz de levar à morte de 50% das cepas avaliadas

CBM90 - Concentração Bactericida Mínima capaz de levar à morte de 90% das cepas avaliadas

C. haemulonii - *Candida haemulonii*

CIF - Concentração Inibitória Fracionada

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CIM50 - Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das cepas avaliadas

CIM90 - Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas avaliadas

CLSI - Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CRAb – *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos (do inglês Carbapenem-resistant *A. baumannii*)

Cu-fendiona - $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico

DO - Densidade Ótica

E. coli - *Escherichia coli*

E. faecium – *Enterococcus faecium*

ESBL - Beta-Lactamases de Espectro Estendido (do inglês, *extended-spectrum beta-lactamases*)

EPA – Efeito pós-antibiótico

FAPES - Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo

FDA - (do inglês, *food and drug administration*)

Fenantrolina - 1,10-fenantrolina

Fendiona - 1,10-fenantrolina-5,6-diona

G. mellonella – *Galleria mellonella*

IMP - Imipenem

IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde

K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*

LB – Caldo de lisogenia (do inglês *Lysogeny broth*)

LPS - Lipopolissacarídeo

MBL - Metalo-beta-lactamases

MDR - Multirresistência (do inglês *multidrug resistance*)

MDRab – *A. baumannii* multirresistente (do inglês multidrug-resistant *A. baumannii*)

MG-CBM - Média Geométrica da Concentração Bactericida Mínima

MG-CIM - Média Geométrica da Concentração Inibitória Mínima

MHA - Ágar Mueller-Hinton

MHB-ca - Caldo Mueller-Hinton cátion ajustado

MPM – Meropenem

OMS - Organização Mundial da Saúde

OXA - Oxacilinase

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*

PAV - Pneumonia Associada à Ventilação

PBP - Proteína ligante de penicilina (do inglês *penicillin binding protein*)

PBS - Tampão Fosfato Salino (do inglês, *Phosphate-buffered saline*)

pH - Potencial hidrogeniônico

PK/PD - Farmacocinética e farmacodinâmica

RAM – Resistência Antimicrobiana

RESBAC - Laboratório de Resistência Antimicrobiana

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

TSB - Caldo Triptona de Soja (do inglês *Tryptone Soya Broth*)

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Revisão de literatura	18
2.1 Resistência a antimicrobianos e necessidade de novas terapias.....	18
2.2 Complexos metálicos derivados da fendiona.....	19
2.3 Terapia antivirulência e o potencial dos complexos metálicos à base de fendiona nessa abordagem inovadora.....	23
2.4 Estudos farmacodinâmicos em candidatos a fármacos antimicrobianos.....	26
2.5 <i>Acinetobacter baumannii</i>	28
3. Justificativa	34
4. Objetivos	36
5. Materiais e métodos	37
<u>Procedimentos Gerais</u>	
5.1 Compostos.....	37
5.2 Amostras bacterianas.....	37
5.2.1 Confirmação da identificação por MALDI-TOF/MS.....	39
5.2.2 Determinação da suscetibilidade às polimixinas.....	39
5.3 Análises estatísticas.....	40
<u>Parte I: Determinação de parâmetros farmacodinâmicos dos complexos metálicos</u>	
5.4 Relação exposição-resposta.....	41
5.5 Fracionamento de doses.....	41
5.6 Efeito pós-antibiótico.....	42
5.7 Impacto do inóculo sobre a CIM.....	43
5.8 Potencial de desenvolvimento de resistência.....	44
<u>Parte II: Investigação de Atributos de virulência em <i>A. baumannii</i></u>	
5.9 Determinação de fenótipo mucoide.....	45
5.10 Atividade hemolítica.....	45
5.11 Motilidade de superfície.....	46
5.12 Propriedades da superfície celular.....	46
5.13 Formação de biofilme em substratos distintos.....	47
5.14 Autoagregação.....	48

6.15 Virulência em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	48
6. Resultados	50
6.1 Amostras bacterianas.....	50
6.1.1 Confirmação da identificação por MALDI-TOF/MS.....	50
6.1.2 Suscetibilidade às polimixinas.....	50
<u>Parte I: Determinação de parâmetros farmacodinâmicos dos complexos metálicos</u>	
6.2 Relação exposição-resposta.....	52
6.3 Fracionamento de doses.....	55
6.4 Impacto do inóculo sobre a CIM.....	58
6.5 Efeito pós-antibiótico.....	60
6.6 Potencial de desenvolvimento de resistência.....	63
<u>Parte II: Investigação de Atributos de virulência em <i>A. baumannii</i></u>	
6.7 Fenótipo mucoide.....	65
6.8 Atividade hemolítica.....	68
6.9 Motilidade de superfície.....	68
6.10 Propriedades da superfície celular.....	70
6.11 Formação de biofilme em substratos distintos.....	72
6.12 Autoagregação.....	73
6.13 Virulência em modelo de <i>Galleria mellonella</i>	75
7. Discussão	78
8. Conclusões	96
9. Referências bibliográficas	98
10. Anexos	120
10.1 Manuscrito submetido à revista “Biometals”.....	120

1. Introdução

A crescente resistência a antimicrobianos (RAM) tem provocado uma escassez crítica de opções terapêuticas eficazes, especialmente no combate a infecções bacterianas por cepa multirresistentes (MDR, do inglês *multidrug resistant*), que representam um grande desafio clínico e uma grave ameaça à saúde pública (BARAN; KWIATKOWSKA; POTOCKI, 2023; SAHA; SARKAR, 2021). Em 2019, a RAM em bactérias foi associada a uma mortalidade próxima de 4,95 milhões, com seis patógenos principais - *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* - sendo responsáveis por 3,57 milhões dessas mortes (MURRAY et al., 2022). Entre os patógenos mais problemáticos, *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos (CRAB, do inglês *Carbapenem-resistant A. baumannii*) destaca-se por causar infecções graves em ambientes hospitalares, com altas taxas de mortalidade devido à resistência a antimicrobianos de “última linha” (CAVALLO et al., 2023; LI et al., 2024; MANCUSO et al., 2023). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou cepas CRAB como prioridade máxima para pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos, enfatizando a urgente necessidade de alternativas terapêuticas inovadoras (OMS, 2017; OMS, 2024). Nesse cenário, pesquisadores têm buscado ativamente novas abordagens para combater esses patógenos críticos, visando superar as limitações das terapias antimicrobianas atuais e reduzir o impacto devastador da RAM na saúde pública (GUPTA; SHARMA, 2022; BUTLER et al., 2022).

Em resposta à rápida evolução da RAM e aos desafios do desenvolvimento de antimicrobianos com novos mecanismos de ação, observa-se atualmente um interesse renovado nos complexos metálicos como potenciais agentes antimicrobianos, oferecendo uma alternativa promissora aos antibióticos convencionais (EVANS; KAVANAGH, 2021). A diversidade de metais, ligantes e geometrias presentes nos compostos de coordenação revela um campo de pesquisa amplamente inexplorado, tornando esses compostos particularmente atraentes para o desenvolvimento de novas classes antimicrobianas (RAKSHIT et al., 2023). Suas propriedades estruturais e eletrônicas singulares proporcionam vasta diversidade biológica e química, contribuindo para múltiplos mecanismos de ação que os diferenciam dos antibióticos orgânicos tradicionais (CLAUDEL; SCHWARTE;

FROMM, 2020; FREI, 2023). Conseqüentemente, diversos compostos antimicrobianos à base de metais estão avançando em ensaios clínicos e são considerados fortes candidatos para aprovação clínica futura (FREI, 2023; O'SHAUGHNESSY et al., 2022). Um destaque nesse campo é a 1,10-fenantrolina (fenantrolina) e seu derivado, a 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), notáveis por suas características estruturais exclusivas e versatilidade na formação de complexos estáveis (VIGANOR et al., 2017). Complexos de metais de transição contendo fenantrolina ou seus derivados demonstraram atividades terapêuticas promissoras contra espécies de bactérias, fungos, parasitas e vírus, surgindo como potenciais alternativas terapêuticas ou adjuvantes aos antimicrobianos existentes (GANDRA et al., 2020; MOHAN; CHOUDHARY, 2021; OLIVEIRA et al., 2023; O'SHAUGHNESSY et al., 2022; VIGANOR et al., 2015).

Os complexos metálicos à base de fenantrolina e seus derivados apresentam potente atividade antibacteriana, principalmente devido às suas propriedades quelantes, que sequestram metais essenciais ao metabolismo e aos processos patogênicos bacterianos (MCCANN et al., 2012; SANTOS et al., 2012). Além do efeito quelante, os complexos de fenantrolina e fendiona são reconhecidos por induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), que causam danos oxidativos a biomoléculas essenciais, incluindo lipídios de membrana, proteínas e DNA (KELLETT et al., 2011; SOUSA et al., 2023; VIGANOR et al., 2017). Especificamente, os complexos metálicos derivados de fendiona têm demonstrado uma notável capacidade de interação com o DNA bacteriano, provocando danos oxidativos e culminando na clivagem do material genético, sugerindo que parte da sua atividade antibacteriana pode ser atribuída a esse efeito (GALDINO et al., 2022; SUBHAN et al., 2015). A combinação desses múltiplos mecanismos destaca o potente e versátil perfil antimicrobiano dos complexos à base de fendiona. Nosso grupo de pesquisa investigou a atividade antibacteriana da fendiona e seus complexos, em particular, $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ (Cu-fendiona) e $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$ (Ag-fendiona). Foi demonstrado que tanto a fendiona livre de metais quanto Cu-fendiona e Ag-fendiona podem inibir o crescimento de *P. aeruginosa* (VIGANOR et al., 2015), *A. baumannii* produtoras de carbapenemase (VENTURA et al., 2020) e *K. pneumoniae* (PEREGRINO et al., 2021).

Avaliar as propriedades farmacodinâmicas (PD) de um candidato a antimicrobiano nas fases iniciais de desenvolvimento é crucial para entender seus

mecanismos de ação, otimizar os resultados terapêuticos e mitigar os riscos de resistência (MOZHAYSKIY; TAGKOPOULOS, 2013). Essa abordagem reduz o tempo e o custo de desenvolvimento de fármacos, aumentando a probabilidade de sucesso em ensaios clínicos futuros. Avaliações PD em fases pré-clínicas, analisando o curso temporal dos efeitos antimicrobianos, bem como o padrão de morte e recuperação bacteriana, oferecem uma compreensão mais abrangente do potencial terapêutico do composto, indo além das avaliações tradicionais baseadas apenas na concentração inibitória mínima (CIM) (MINICHMAYR; CLIMENT; FRIBERG, 2022; GASCÓN et al., 2021). Embora a CIM seja um indicador útil da potência antimicrobiana, ela apresenta limitações devido às condições estáticas de concentração, que não refletem a dinâmica das condições *in vivo* (YU et al., 2019). Ainda, a CIM, determinada por meio de diluições seriadas, pode ser relativamente imprecisa, visto que diferentes padrões de crescimento bacteriano e cinéticas de morte em resposta ao agente antimicrobiano podem resultar em valores idênticos de CIM (VAN OS; ZEITLINGER, 2021; YU et al., 2019). Investigações PD mais avançadas são essenciais para determinar os perfis de atividade antimicrobiana, as taxas de morte bacteriana e a duração dos efeitos pós-antibióticos (LISTER, 2006; GASCÓN et al., 2021). Em resumo, avaliações precoces de PD desempenham um papel crucial na identificação de parâmetros que influenciam a eficácia clínica, estabelecendo metas ideais para alcançar o efeito terapêutico máximo e garantindo as melhores condições para ensaios clínicos subsequentes (BISSANTZ et al., 2024; JORDA; ZEITLINGER, 2020; PALMER et al., 2022).

2. Revisão da Literatura

2.1 Resistência a antimicrobianos e necessidade de novas terapias

A RAM é uma grave questão de saúde pública, que ameaça a capacidade da medicina moderna de combater doenças infecciosas. Os dados alarmantes, fornecidos por organizações que monitoram a RAM, indicam que ela atingiu um estágio crítico, sendo, portanto, declarada como uma das ameaças globais à saúde da humanidade (MURRAY et al., 2022; O'NEIL, 2016). A redução da eficácia dos antimicrobianos é um fenômeno natural, mas que, preocupantemente, é agravado pelo uso inadequado desses fármacos na saúde humana e animal, exacerbado pela globalização e pressionado pela falta de investimento e desenvolvimento de novos medicamentos e abordagens terapêuticas (BARAN; KWIATKOWSKA; POTOCKI, 2023; SAHA; SARKAR, 2021). A pressão seletiva decorrente da utilização dos antimicrobianos tem acelerado a disseminação da RAM, tornando real a possibilidade de uma era pós-antibiótica, em que infecções comuns, bem como pequenas injúrias, poderão levar à morte (HANSSON; BRENTHEL, 2022; WANG et al., 2019). Atualmente, a RAM representa um dos maiores desafios para a comunidade médica, com sérias implicações terapêuticas e econômicas, como evidenciado pelo crescente número de infecções causadas por microrganismos que não respondem a nenhuma classe de antimicrobianos disponível para uso clínico (CEPAS et al., 2019; LAXMINARAYAN et al., 2016).

A emergência de patógenos MDR é considerada uma grande ameaça aos serviços de saúde, visto que infecções causadas por esses microrganismos estão associadas a elevado risco de mortalidade, tempo de hospitalização prolongado e aumento dos custos com o paciente (FALCONE; PATERSON, 2016). Entre os patógenos MDR, definidos como não suscetíveis a pelo menos um agente em três ou mais categorias antimicrobianas distintas, grande destaque é dado às espécies de Bacilos Gram-negativos (BGN) resistentes a beta-lactâmicos, seja pela produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês *extended-spectrum beta-lactamase*) ou pela produção de carbapenemases (RELLO; BUNSOW; PEREZ, 2016). Os carbapenêmicos ainda representam a terapia de primeira linha para infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBL, e são frequentemente

utilizados como último recurso para tratamento de infecções causadas por BGN MDR (VADING et al., 2018). Entretanto, os mecanismos moleculares de resistência continuam a evoluir, e o crescente número de isolados carreando genes de carbapenemases torna essas infecções um problema global de saúde pública cada vez mais importante (NORDMANN; POIREL, 2019; ZHANEL et al., 2019). A rápida disseminação de elementos genéticos determinantes de resistência entre BGN aumentou a preocupação acerca dos agentes terapêuticos disponíveis, e sobre quanto tempo eles permanecerão efetivos (RELLO; BUNSOW; PEREZ, 2016).

2.2 Complexos metálicos derivados da fendiona

Em resposta à rápida evolução da RAM e aos desafios do desenvolvimento de alternativas terapêuticas com novos mecanismos de ação, tem-se observado um renovado interesse nos compostos antimicrobianos à base de metais (EVANS; KAVANAGH, 2021). Embora o uso de metais com propriedades antimicrobianas remonte ao século XVII, a atual proeminência dos complexos metálicos deve-se à sua diversidade estrutural e funcional, oferecendo grande potencial para o desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos, atuando por mecanismos distintos em relação aos antibióticos tradicionais (RAKSHIT et al., 2023). Esses complexos são formados por ligações coordenadas entre moléculas doadoras de elétrons, chamadas ligantes, e íons metálicos, que atuam como aceptores de elétrons (ALFARO-FUENTES et al., 2017). A química de coordenação de complexos metálicos é amplamente diversificada, variando conforme as propriedades químicas do metal e do ligante, como composição e estrutura dos átomos centrais, quantidade e disposição das regiões doadoras, presença de ligantes auxiliares, entre outras (CLAUDEL; SCHWARTE; FROMM, 2020). Ainda, a reatividade dos complexos metálicos é influenciada por fatores como modos de coordenação, locais de ligação e parâmetros geométricos (KÓTAI, 2024). Assim, a diversidade dos compostos de coordenação, aliada à eficácia antimicrobiana, faz desses compostos candidatos promissores para novas abordagens terapêuticas no combate a infecções resistentes. Como resultado, diversos antimicrobianos à base de metais estão avançando em ensaios clínicos, sendo considerados fortes candidatos à futura aprovação clínica (FREI, 2023; O'SHAUGHNESSY et al., 2023).

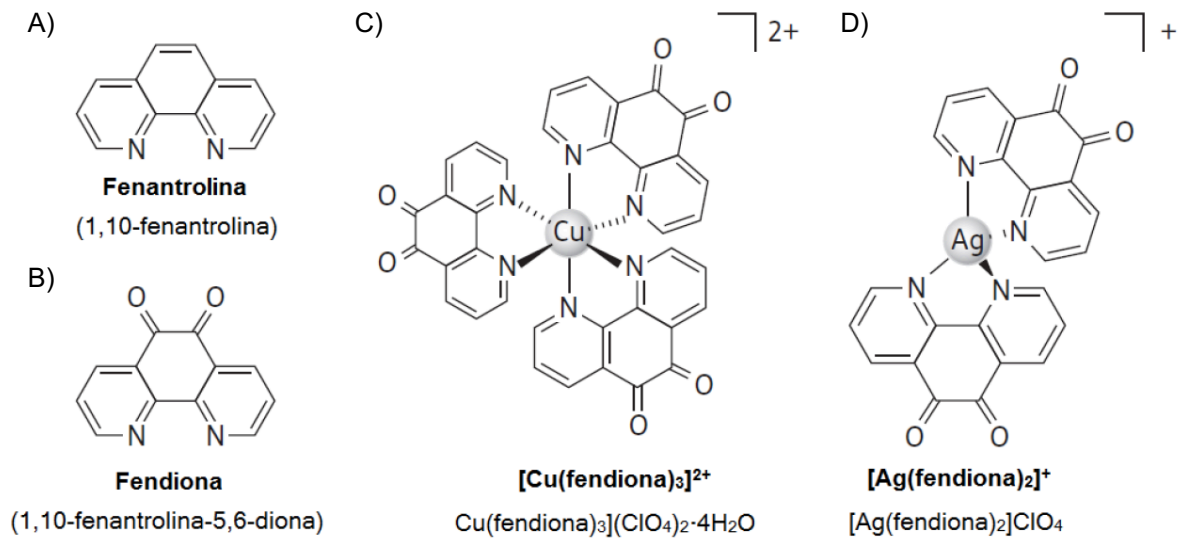
A fenantrolina (Figura 1A) é amplamente reconhecida na química de coordenação por sua habilidade como ligante heterocíclico bidentado, formando complexos estáveis com íons metálicos, especialmente metais de transição, por meio de seus dois átomos de nitrogênio (BENCINI; LIPPOLIS, 2010; SAMMES; YAHIOGLU, 1994). Os metais coordenados à fenantrolina apresentam maior estabilidade e reatividade, características cruciais para as aplicações biológicas dos complexos metálicos resultantes (VIGANOR et al., 2017). Além das propriedades estruturais versáteis, a fenantrolina possui ação antimicrobiana descrita contra uma ampla gama de patógenos, devido principalmente a seu efeito quelante, interferindo na homeostase de metais essenciais (MCCANN et al., 2012; SOUSA et al., 2023). Nas últimas décadas, a fenantrolina tem despertado grande interesse no desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos. Diversos estudos recentes demonstram que os complexos metálicos contendo esse ligante apresentam significativa atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária, tornando-a um candidato promissor para o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas (AHMED et al., 2019; O'SHAUGHNESSY et al., 2023; SOUSA et al., 2023).

A fenantrolina tem sido modificada para melhor modular sua atividade antimicrobiana, originando novos compostos, como a fendiona (Figura 1B), que resulta da adição de dois grupos carbonila nas posições 5 e 6 (MCCANN et al., 2004). A estrutura química da fendiona confere um caráter bifuncional ao composto, tornando-o um ligante ainda mais versátil, exibindo dois sítios reativos distintos: a função quinonoide e a função diimínica (CALUCCI et al., 2006). A função quinonoide é responsável pela capacidade redox da fendiona, levando à geração de ROS, enquanto a função diimínica permite sua atuação como quelante de metais de transição (GRANATO et al., 2017; MCCANN et al., 2004). A combinação dessas propriedades - capacidade redox e atividade quelante - torna a fendiona potencialmente mais ativa em comparação com a fenantrolina (MCCANN et al., 2012). Em um estudo conduzido por Roy et al. (2008) com amostras de *E. coli* e *Bacillus subtilis*, a fendiona demonstrou efeito significativamente superior (CIMs = 2 e 0,5 µg/mL, respectivamente) em comparação com a fenantrolina (CIMs = 25 e 15 µg/mL, respectivamente). Resultados semelhantes foram observados por Ventura et al. (2020) em amostras de *A. baumannii*, em que a fendiona (CIM = 9,44 µM) exibiu atividade antimicrobiana consideravelmente superior à da fenantrolina (CIM = 70,46 µM). A eficácia de fendiona contra uma ampla gama de espécies bacterianas foi

recentemente demonstrada por Meade, Savage e Garvey et al. (2021), sendo observada a inibição completa de todas as espécies testadas (*A. baumannii*, *Acinetobacter beijerinckii*, *Acinetobacter lwoffii*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus penneri*, *Proteus mirabilis*, *Psychrobacter pulmonis* e *Neisseria gonorrhoeae*). Além disso, foi sugerido que as propriedades quelantes da fendiona apresentam potencial promissor no tratamento de BGN produtores de metalo-beta-lactamases (MBLs), uma vez que as essas são enzimas dependentes de Zn^{2+} (MEADE; SAVAGE; GARVEY, 2021).

A coordenação de íons metálicos a ligantes hidrofóbicos, como fenantrolina e fendiona, aumenta a permeabilidade através da membrana celular dos microrganismos, melhorando a biodisponibilidade e resultando em um incremento significativo na atividade antimicrobiana dos complexos metálicos formados (TURNER, 2023; VIAGANOR et al., 2017). Ainda, os efeitos antimicrobianos desses ligantes são potencializados pela toxicidade exercida pelos íons metálicos sobre os microrganismos, com diversos estudos demonstrando que complexos metálicos derivados da fenantrolina e da fendiona apresentam efeitos inibitórios mais pronunciados em comparação aos ligantes isolados (SANTOS et al., 2014). O desenvolvimento de novos metalocompostos contendo esses ligantes tem indicado potencial terapêutico para o tratamento de infecções causadas por bactérias, fungos e parasitas (AHMED et al., 2022, GANDRA et al., 2020; GRANATO et al., 2017; OLAR; BADEA; CHIFIRIUC, 2022; OLIVEIRA et al., 2023; RIGO et al., 2019). Resultados particularmente encorajadores foram observados para os compostos resultantes da coordenação de fendiona a íons de cobre (Cu^{2+}) e prata (Ag^+), Cu-fendiona (Figura 1C) e Ag-fendiona (Figura 1D), respectivamente. Esses complexos metálicos demonstraram potencial antibacteriano significativo contra cepas clínicas de *P. aeruginosa* (VIGANOR et al., 2015), *A. baumannii* (VENTURA et al., 2020), *K. pneumoniae* (PEREGRINO et al., 2021) abrangendo diferentes perfis de suscetibilidade, como MDR e resistência a carbapenêmicos.

Figura 1 - Estruturas químicas de 1,10-fenantrolina, 1,10-fenantrolina-5,6-diona, $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$



Fonte: adaptado de VIGANOR et al. (2015)

Os complexos metálicos apresentam mecanismos de ação antimicrobiana múltiplos e inovativos, que diferem significativamente dos antibióticos convencionais, de natureza puramente orgânica (CLAUDEL; SCHWARTE; FROMM, 2020; EVANS; KAVANAGH, 2021). As propriedades estruturais e eletrônicas singulares desses compostos possibilitam interações com diversos alvos celulares, proporcionando uma abordagem terapêutica versátil e multimodal (FREI, 2023; LEMIRE, 2013; TURNER, 2023). Em particular, os complexos metálicos à base de fenantrolina e seus derivados apresentam potente atividade antibacteriana, principalmente devido às suas propriedades quelantes, que sequestram metais essenciais ao metabolismo bacteriano, como ferro, cobre e zinco, perturbando a homeostase desses íons. Essa desestabilização compromete o funcionamento de proteínas metalodependentes cruciais para o crescimento, sobrevivência e patogenicidade bacteriana (MCCANN et al., 2012; SANTOS et al., 2012). Além do efeito quelante, os complexos de fenantrolina e fendiona são reconhecidos por induzir a geração de ROS, que causam danos oxidativos a biomoléculas essenciais, incluindo lipídios de membrana, proteínas e DNA (KELLETT et al., 2011; SOUSA et al., 2023; VIGANOR et al., 2017). A formação de ROS pode levar à peroxidação lipídica, disfunção de enzimas antioxidantes e fragmentação do material genético, resultando na morte celular bacteriana (ARTHI et

al., 2023; O'SHAUGHNESSY et al., 2023). Especificamente, os complexos metálicos derivados de fendiona têm demonstrado uma notável capacidade de interação com o DNA bacteriano, provocando danos oxidativos e culminando na clivagem do material genético, sugerindo que parte da sua atividade antibacteriana pode ser atribuída a esse efeito (GALDINO et al., 2022; SUBHAN et al., 2015).

A abordagem “multialvo” (do inglês *multi-target*) dos complexos metálicos é um atributo terapêutico especialmente relevante no contexto da RAM, oferecendo vantagens significativas no combate a patógenos MDR. Primeiramente, por interferir em múltiplos processos na célula microbiana, combinando efeitos de disfunção enzimática, interação com o DNA, desestabilização de membranas e geração de ROS, esses compostos são capazes de contornar os mecanismos de resistência já estabelecidos (EVANS; KAVANAGH, 2021; VIGANOR et al., 2017). Portanto, a natureza multifacetada dos complexos metálicos contribui para uma eficácia terapêutica mais abrangente, especialmente contra bactérias que exibem resistência a antibióticos tradicionais. Além disso, essa abordagem multialvo diminui significativamente a probabilidade de surgimento de novas resistências, pois tal processo exigiria o acúmulo de diversas mutações em vias distintas em uma mesma célula microbiana (BREMMER, 2023; FREI, 2023). Nesse sentido, os complexos metálicos à base de fenantrolina e fendiona surgem como alternativas promissoras para o tratamento de infecções por patógenos críticos, oferecendo respostas terapêuticas robustas e minimizando o risco de desenvolvimento de resistência.

2.3 Terapia antivirulência e o potencial dos complexos metálicos à base de fendiona nessa abordagem inovadora

O tratamento de infecções bacterianas está se tornando cada vez mais desafiador devido à diminuição da eficácia dos antimicrobianos disponíveis, como consequência do desenvolvimento de resistência, e à lenta taxa de desenvolvimento de novas terapias anti-infecciosas (BUTLER et al., 2022; CALVERT; JUMDE; TITZ, 2018). Além disso, a falta de diversidade nos alvos celulares dos antibióticos tradicionais agrava o problema (VIGANOR et al., 2017). Nesse contexto, a terapia antivirulência surge como uma alternativa promissora para o tratamento de infecções persistentes (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007; DICKEY; CHEUNG; OTTO, 2017; LAU et al., 2023). Esta abordagem visa reduzir a patogênese ao inibir a

expressão ou a atividade biológica dos fatores de virulência, sem necessariamente afetar funções microbianas essenciais (LAU et al., 2023; MARTÍNEZ et al., 2019). Com a capacidade de inibir os mecanismos de virulência bacteriana, os compostos antivirulência podem potencializar o sistema imunológico do hospedeiro para impedir a colonização inicial ou erradicar infecções já estabelecidas (CALVERT; JUMDE; TITZ, 2018). Algumas vantagens propostas para essa estratégia consistem na minimização da pressão seletiva evolucionária que conduz ao desenvolvimento da resistência e na redução de impactos na microbiota do hospedeiro (DICKEY; CHEUNG; OTTO, 2017; MOUSSOUNI et al., 2019). Ainda, os compostos antivirulência podem ser utilizados em terapias combinatórias com antibióticos clássicos, proporcionando um controle sinérgico sobre infecções de difícil tratamento (MICHAUD et al., 2016; RASKO; SPERANDIO, 2010). A terapia antivirulência, portanto, representa uma abordagem terapêutica inovadora e possivelmente complementar aos antimicrobianos tradicionais, oferecendo uma estratégia adicional para enfrentar a RAM (CALVERT; JUMDE; TITZ, 2018).

A ação antivirulência tendo como alvo o biofilme microbiano representa uma abordagem inovadora no desenvolvimento de terapias anti-infecciosas, especialmente frente às limitações dos tratamentos tradicionais em erradicar infecções associadas a biofilmes (JIANG; GENG; BAI, 2020; MARTÍNEZ et al., 2019; ROY et al., 2018). Formados por uma matriz extracelular composta de substâncias como DNA, proteínas e polissacarídeos, os biofilmes protegem os microrganismos de estresses ambientais, incluindo substâncias antimicrobianas e componentes do sistema imunológico do hospedeiro (EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018). Infecções causadas por patógenos formadores de biofilme são particularmente resistentes à terapia antimicrobiana convencional, muitas vezes exigindo doses elevadas e estratégias combinadas para controle eficaz (CEPAS et al., 2019; FLORES; TORRES; BRAVO. 2024). Nesse contexto, as terapias antivirulência oferecem novas perspectivas, visando a modulação das interações microbianas e seu comportamento dentro do biofilme. Entre as estratégias mais promissoras está a inibição do *quorum sensing*, um sistema de comunicação bacteriana que coordena a formação e manutenção do biofilme (OLAR; BADEA; CHIFIRIUC, 2022). Ao interferir com esse processo, esses compostos antivirulência previnem a maturação do biofilme e desestabilizam sua estrutura, facilitando a ação de antibióticos e o ataque do sistema imune (JIANG; GENG; BAI, 2020; MARTÍNEZ et al., 2019; ROY et al., 2018). Outras

abordagens antivirulência incluem, principalmente: a modulação da produção de fatores de virulência por meio da interferência nas redes de *quorum sensing*; a neutralização de toxinas, que visa bloquear a ação de toxinas nas células-alvo do hospedeiro; e a ação sobre microdomínios funcionais da membrana (MARTÍNEZ et al., 2019).

Estudos anteriores destacam o potencial dos compostos derivados da fenantrolina e da fendiona como agentes antivirulência. Complexos de prata (I)-fenantrolina demonstraram eficácia contra o fungo *Fonsecaea pedrosoi*, principal agente etiológico da cromoblastomicose, afetando atributos de virulência como a produção de peptidases, melanina e biofilme (SOUSA et al., 2023). Outros estudos evidenciam a inibição de peptidases, especialmente metalopeptidases, pelos complexos metálicos derivados da fendiona de forma consistente em importantes parasitas, como *Trichomonas vaginalis* e *Leishmania* spp. (OLIVEIRA et al., 2023; RIGO et al., 2023). A fendiona livre (não coordenada) mostrou-se eficaz na erradicação de biofilmes de *Enterococcus faecalis* (TAY et al., 2015). Ainda, a fenantrolina, a fendiona e seus complexos Cu-fendiona e Ag-fendiona modularam negativamente a expressão de diversos atributos de virulência em cepas clínicas de *P. aeruginosa*, como a produção de elastase e pirocianina, a interação com células epiteliais pulmonares, além do biofilme (GALDINO et al., 2017; SILVA, 2014; VIGANOR et al., 2015). Os complexos metálicos, particularmente, demonstraram potente ação antibiofilme, sendo capazes de inibir sua formação e desestruturar biofilmes maduros (SILVA, 2014). De maneira semelhante, Ventura et al. (2020) demonstraram que fenantrolina, fendiona, Ag-fendiona e Cu-fendiona exibiram atividade antibiofilme em cepas clínicas de *A. baumannii*. Em concentrações de 0,5x CIM, esses compostos inibiram a formação de biofilme, reduzindo a biomassa em aproximadamente 79%, 76%, 61% e 57%, e a atividade metabólica em 73%, 66%, 43% e 56%, respectivamente. Os compostos também foram capazes de reduzir a viabilidade do biofilme maduro de maneira dose-dependente, com destaque para Cu-fendiona e Ag-fendiona, ambos capazes de reduzir 50% da viabilidade do biofilme em baixas concentrações de 13,54 e 22,05 μM , respectivamente (VENTURA et al., 2020). Esses achados sugerem que esses complexos possuem potencial tanto como antimicrobianos quanto como moduladores de importantes atributos de virulência em infecções bacterianas causadas por *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.

2.4 Estudos farmacodinâmicos em candidatos a fármacos antimicrobianos

A pesquisa por terapias antimicrobianas tem focado no desenvolvimento de novas classes e, nesse processo, a avaliação dos índices de PK e PD dos candidatos a fármacos é crucial, pois permite compreender as relações de exposição e efeito entre os antimicrobianos, os patógenos e os hospedeiros (MOUTON et al., 2011). Baseado nos perfis dessas relações é possível otimizar e maximizar os resultados terapêuticos, além de atenuar o risco de desenvolvimento de resistência (JORDA; ZEITLINGER, 2020). Diferentes modelos integrando dados de PK e PD podem ser empregados visando esses objetivos ao longo das fases de desenvolvimento de fármacos. Nesse contexto, dados não clínicos de PD, que elucidam o tempo de efeito antimicrobiano e o padrão de morte/crescimento bacteriano, devem ser utilizados para criar uma base sólida para o posterior desenvolvimento de modelos PK/PD mais complexos (TÄNGDÉN et al., 2020). A investigação de parâmetros PK/PD nas fases iniciais do desenvolvimento de fármacos tem se tornado cada vez mais relevante, especialmente para candidatos antimicrobianos (LISTER, 2006). Esses dados são fundamentais para orientar de forma racional a definição de esquemas de dosagem para estudos clínicos futuros. Além disso, os parâmetros PK/PD determinados na fase pré-clínica desempenham um papel crucial ao apoiar e validar observações feitas em estudos clínicos com humanos (BULITTA et al., 2019; TÄNGDÉN et al., 2020). Dessa forma, a identificação de parâmetros PK/PD ideais nos testes pré-clínicos, oferece a um novo antimicrobiano a maior chance possível de alcançar a eficácia nos estudos clínicos posteriores, além de contribuir para a redução do tempo e dos custos de desenvolvimento (GUNDERSON et al., 2001; MINICHMAYR; CLIMENT; FRIBERG, 2022; PALMER et al., 2022).

Para avaliar de forma eficiente o impacto dos parâmetros de PK/PD, diversos métodos, tanto *in vitro* como *in vivo*, são empregados e suas aplicações são frequentemente discutidas na literatura (BULITTA et al., 2019; GLOEDE et al., 2010; VAN OS; ZEITLINGER, 2021). A CIM é o parâmetro mais comumente utilizado como indicador da potência antimicrobiana, fornecendo informações valiosas, que ajudam a definir o potencial terapêutico de um novo agente anti-infeccioso (LISTER, 2006; SCHUCK; DERENDORF, 2005). Entretanto, uma abordagem de PK/PD baseada apenas em valores de CIM apresenta diversas limitações, tanto do ponto de vista de PK quanto de PD. Especialmente sobre a PD, a CIM é um indicador precário da

eficácia antimicrobiana, visto que é determinado sob concentrações estáticas, o que não reflete o cenário *in vivo*, em que as concentrações flutuam entre as doses. Além disso, a CIM determinada com concentrações que dobram de uma diluição para a outra, não consiste em uma estimativa precisa (BUFFÉ; ARAÚJO; COSTA, 2001; YU et al., 2019). A CIM também não fornece nenhuma informação sobre a relação da atividade antimicrobiana em função do tempo. Assim, diferentes combinações de cinética de crescimento e morte bacteriana, em resposta ao agente antimicrobiano, podem levar à mesma CIM no final do período de incubação (SCHUCK; DERENDORF, 2005). Portanto, a determinação da CIM é considerada um importante parâmetro inicial, devendo ser seguida de avaliações de PK/PD mais avançadas, que visam definir: (i) os perfis da atividade antimicrobiana (bacteriostática x bactericida; concentração-dependente x tempo-dependente); (ii) a taxa de morte bacteriana; (iii) duração do efeito pós-antibiótico; (iv) os impactos do efeito de inóculo sobre a atividade antimicrobiana; e (v) quais parâmetros de exposição ao medicamento mais influenciam na eficácia clínica (LISTER, 2006; SCHUCK; DERENDORF, 2005).

Na determinação do perfil PD de um candidato a fármaco antimicrobiano, outros experimentos podem ser realizados nas fases iniciais do desenvolvimento, a fim de fornecer uma visão mais abrangente sobre seu potencial terapêutico, além de guiar o *design* de experimentos de avaliação PK/PD *in vivo* e a investigação do mecanismo de ação do composto sobre o alvo no patógeno (LISTER, 2006; PALMER et al., 2022). Os procedimentos pré-clínicos *in vitro* que visam preencher as lacunas deixadas pela determinação da CIM incluem as avaliações da relação exposição-resposta, da duração do efeito pós-antibiótico e do efeito de inóculo. Especificamente, o desenvolvimento de curvas de tempo-morte revela padrões da atividade antimicrobiana ao longo do tempo, fornecendo descrições detalhadas e precisas das mudanças dinâmicas no crescimento e na morte bacteriana sob diferentes condições e concentrações dos compostos (ZHANG et al., 2022). Por fim, a literatura ainda sugere a investigação do potencial de desenvolvimento de resistência e/ou fenômenos específicos de recalcitrância, analisando a adaptação do patógeno a condições subinibitórias do composto antimicrobiano (LI; ZHU, 2002; MOZHAYSKIY; TAGKOPOULOS, 2013). Dessa forma, os testes PD *in vitro* representam uma etapa complementar no decorrer do processo de desenvolvimento de um agente anti-infeccioso, com aplicações desde a bancada até a utilização de modelos animais e, eventualmente, até os testes em humanos (GUNDERSON et al., 2001). Em suma, a

pesquisa e o desenvolvimento de novos antimicrobianos, sustentados por uma robusta coleta de dados PD, permite estabelecer os índices ideais para alcançar o efeito terapêutico máximo e garantir as melhores condições para ensaios clínicos subsequentes (LISTER, 2006; JORDA; ZEILTLINGER, 2020; PALMER et al., 2022). Em última análise, essa abordagem inovadora é essencial para garantir a longevidade da eficácia dos tratamentos antimicrobianos desenvolvidos, diante de um cenário de resistência em constante evolução (BISSANTZ et al., 2024).

2.5 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii é um cocobacilo Gram-negativo, que apresenta características microbiológicas particulares, incluindo metabolismo estritamente aeróbico, atividade catalase positiva e oxidase negativa, ausência de produção de indol (FLORES; TORRES; BRAVO, 2024). Embora essa espécie seja tradicionalmente descrita como não-móvel, muitas cepas podem exibir tipos de motilidade "espasmódica" e de superfície (MOUBARECK; HALAT, 2020). *A. baumannii* é frequentemente associado a infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS), causando infecções se manifestam, mais comumente, como pneumonia associada à ventilação (PAV) e infecções da corrente sanguínea associadas a cateter central, ambas com taxas de mortalidade chegando a 35% (ANTUNES; VISCA; TOWNER, 2014; GEDEFIE et al., 2021). Menos frequentemente, *A. baumannii* causa infecções na pele e tecidos moles, bem como infecções em locais cirúrgicos e infecções do trato urinário associadas a cateteres. Comum a cada um desses cenários é a ruptura de uma barreira anatômica que permite o acesso desse patógeno oportunista diretamente no local da infecção (MOUBARECK; HALAT, 2020; OYEJOBI et al., 2022). Infecções adquiridas na comunidade causadas por *A. baumannii* também têm sido relatadas, porém, limitadas a pacientes com comorbidades subjacentes, como *diabetes mellitus*, câncer e distúrbios pulmonares obstrutivos, ou condições como tabagismo e etilismo (DEXTER et al., 2015). Estudos recentes indicam *A. baumannii* como um dos principais patógenos associados às IRAS, sendo responsável por aproximadamente 2% dessas infecções nos Estados Unidos e na Europa, e com valores dobrando em regiões como a Ásia e o Oriente Médio, onde a prevalência de MDR é significativamente maior (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017). No Brasil, o cenário é ainda mais preocupante: em um hospital do Rio Grande do Sul, *A. baumannii* foi a espécie mais

isolada, responsável por 17% de todas as infecções (RHODEN et al., 2021). O impacto das infecções por *A. baumannii* é particularmente maior em UTIs, onde a sua prevalência pode ultrapassar 20%, com taxas de mortalidade substancialmente maiores devido à gravidade das condições clínicas dos pacientes (LEE et al., 2017; OYEJOBİ et al., 2022; VINCENT et al., 2009). Em Minas Gerais, uma análise multicêntrica envolvendo UTIs de 28 hospitais, posicionou *A. baumannii* entre as três espécies mais prevalentes, representando 27,1% dos isolados (BRAGA et al., 2018).

A. baumannii representa um desafio clínico significativo devido à sua notável capacidade de desenvolver resistência a um amplo espectro de antimicrobianos, sendo considerado um dos seis principais patógenos associados à mortalidade em decorrência da RAM (MURRAY et al., 2022). A resistência nessa espécie decorre de uma combinação de mecanismos intrínsecos e adquiridos, que tornam o seu manejo clínico cada vez mais complexo. Dessa forma, *A. baumannii* foi incluído no grupo conhecido como “ESKAPEE”, juntamente com *E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, espécies de *Enterobacter* e *E. coli*, considerados patógenos prioritários em termos de saúde pública, frequentemente associados ao perfil de resistência MDR (POMPILIO et al., 2021). A disseminação global de cepas de *A. baumannii* MDR (MDRab) atingiu níveis alarmantes, dificultando significativamente o controle desse patógeno em ambientes nosocomiais. Estima-se que aproximadamente 44% dos isolados de *A. baumannii* sejam MDR, com a maior incidência registrada no Oriente Médio e na América Latina, onde essa taxa pode superar 70%. A resistência não apenas limita severamente as opções terapêuticas, como também desempenha um papel crucial na gravidade das infecções, tornando o tratamento extremamente desafiador. Isso impacta diretamente os desfechos clínicos e eleva os índices de mortalidade. Além disso, as infecções por MDRab resultam em prolongamentos significativos das internações hospitalares, frequentemente exigindo cuidados intensivos prolongados, o que sobrecarrega as UTIs e os recursos hospitalares. O impacto econômico é também expressivo, com elevação substancial dos custos de tratamento devido ao uso prolongado de antimicrobianos de amplo espectro e à necessidade de intervenções médicas mais intensivas, como ventilação mecânica e terapias alternativas. Um recente estudo realizado com pacientes tratados para infecção por *A. baumannii* em hospitais dos EUA, destaca a relevância clínica das infecções causadas por cepas MDR em comparação com cepas não-MDR. Foi demonstrado que pacientes infectados por cepas MDRab apresentam taxas de

mortalidade significativamente mais altas (MDRAb 23,1% versus não-MDRAb 7,7%), além de um aumento de 61% no risco de óbito durante a internação e maiores chances de permanência hospitalar superior a 10 dias. Fatores como insuficiência respiratória aguda, choque e tratamento inadequado foram preditores de desfechos clínicos desfavoráveis, mais frequentes em pacientes com infecções por cepas MDR. Esses achados evidenciam os desafios impostos ao tratamento de infecções por cepas MDRAb, justificando a preocupação crescente com sua disseminação (APPANEAL et al., 2022).

Além do perfil MDR, outro fator que aumenta a preocupação com *A. baumannii* é o desenvolvimento de resistência aos carbapenêmicos, limitando drasticamente as opções de tratamento. Estudos mostram que até 50% das cepas de *A. baumannii* isoladas nos Estados Unidos são resistentes a carbapenêmicos e essa taxa pode chegar a 90% em regiões como o Mediterrâneo, exibindo taxa de mortalidade próxima de 60% (APPANEAL et al., 2022; MURRAY et al., 2022). No contexto nacional, a realidade também se mostra alarmante, com dados de vigilância epidemiológica revelando um aumento expressivo na resistência aos carbapenêmicos, que evoluiu de 16% para 86,6% entre 1997 e 2016 (GALES et al., 2019). Um estudo mais recente, abordando os dados de 2018 do Programa Nacional de Vigilância da Resistência Antimicrobiana no Brasil (BR-GLASS), indicou *A. baumannii* como o patógeno que mais causou preocupação, com taxas de resistência aos carbapenêmicos de 81,4% (PILLONETTO et al., 2021). A OMS reconheceu a gravidade da situação e incluiu as cepas CRAb no grupo mais crítico da lista de patógenos prioritários, divulgada pela primeira vez em 2017. Essa lista abrange os patógenos que representam a maior ameaça à saúde pública, demandando prioridade em pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos antimicrobianos (OMS, 2017). Desde então, observou-se um aumento nos esforços para desenvolver novas classes de antimicrobianos com modos de ação inovadores que evitem a resistência cruzada com mecanismos já existentes, além de abordagens terapêuticas inovadoras, como compostos antivirulência, metalofármacos, vacinas e fagoterápicos (BREMNER, 2023; ISKANDAR et al., 2022; MANCUSO et al., 2023). No entanto, apesar dos esforços atuais, pouco avanço tem sido observado no desenvolvimento de novos antimicrobianos, com a maioria dos agentes recentemente aprovados consistindo em variações de classes já conhecidas (BULMAN et al., 2022; THEURETZBACHER et al., 2023). Assim, em 2024, a OMS publicou uma atualização de sua lista de patógenos prioritários globais, na qual CRAb

permanece classificado no nível mais crítico, destacando que o tratamento de suas infecções continua sendo um importante desafio de saúde pública (OMS, 2024).

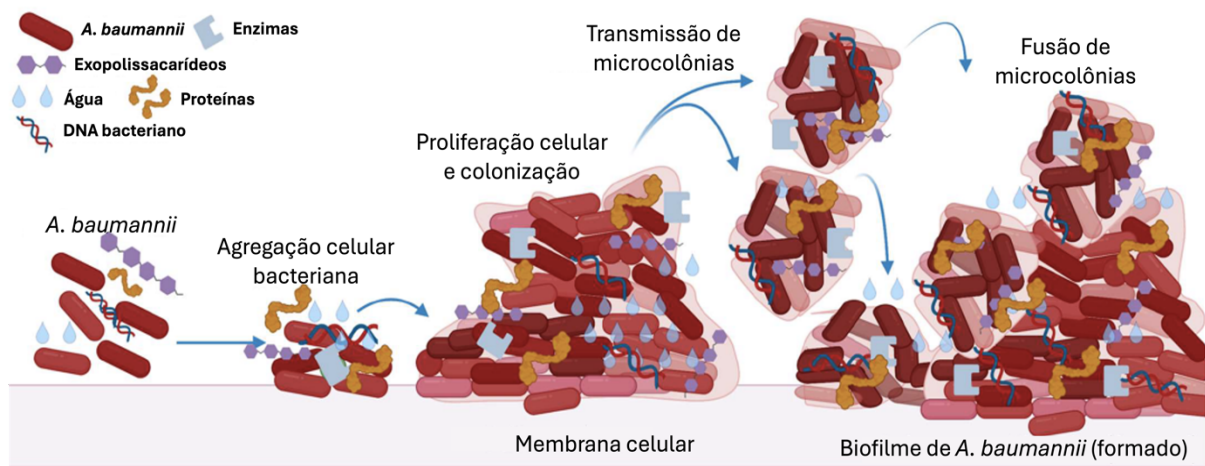
A patogênese de *A. baumannii* é caracterizada por uma complexa interação de diversos mecanismos que permitem a sobrevivência, adaptação e persistência deste patógeno em ambientes clínicos e hospedeiros humanos (SHADAN et al., 2023). Ao contrário de muitos patógenos nosocomiais, que geralmente dispõem de toxinas ou determinantes moleculares específicos para causar doenças, *A. baumannii* utiliza uma estratégia conhecida como “persistir e resistir”, na qual uma combinação de fatores de virulência atua de maneira conjunta para promover infecções (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017; MEA, 2021). Um elemento chave que contribui para a patogenicidade de *A. baumannii* é sua adaptabilidade genética, que lhe permite responder rapidamente a pressões ambientais e condições adversas. Essa bactéria é capaz de sobreviver por períodos prolongados em superfícies úmidas ou secas, mesmo com escassez de nutrientes, tolerando condições físicas variadas e exibindo resistência a desidratação, ao estresse oxidativo e à processos de desinfecção (PALETHORPE et al., 2022). Esses fatores, em conjunto, dificultam a sua erradicação, facilitando tanto a transmissão entre pacientes quanto a persistência de *A. baumannii* em ambientes clínicos e, portanto, consolidando seu papel como um importante patógeno associado a IRAS (MEA, 2021; PAPADOPOULOU et al., 2024; YAO; CHEN; ZHOU, 2023).

A. baumannii apresenta um vasto arsenal de mecanismos de virulência que conferem vantagens em diversas etapas do processo de patogênese, desde a sobrevivência frente ao ataque do sistema imunológico do hospedeiro até a adesão, internalização e morte celular. Os atributos de virulência identificados nessa espécie incluem a formação de biofilme, sistemas de aquisição de micronutrientes, adesão, motilidade, proteínas da membrana externa, lipopolissacarídeos, *quorum sensing* e sistemas de secreção de proteínas (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017; LAW; TAN, 2022; MEA et al., 2021; SHADAN et al., 2023). Entre esses atributos, a formação de biofilme, o *quorum sensing* e os sistemas de aquisição de ferro são os mais frequentemente destacados como alvos promissores para terapias antivirulência contra *A. baumannii* (LAW; TAN, 2022). Embora vários fatores de virulência tenham demonstrado influenciar a patogenicidade de *A. baumannii*, ainda não está claro quais deles contribuem de forma mais significativa para a gravidade das infecções causadas por essa espécie (LUCIDI et al., 2023; TREBOSC et al., 2022). Portanto, a

patogenicidade e a virulência de *A. baumannii* permanecem parcialmente compreendidas, sugerindo a possibilidade da existência de mecanismos ainda não identificados atuando nesse processo (DOLMA et al., 2022; MAURE; ROBINO; HENST, 2023).

Entre os diversos atributos de virulência de *A. baumannii*, a formação de biofilme é considerada um dos mais potentes e significativos. O biofilme constitui um mecanismo de proteção aprimorado contra agentes antimicrobianos, sistemas de defesa imunológica do hospedeiro e diversas condições fisiológicas adversas (DOLMA et al., 2022; FLORES; TORRES; BRAVO, 2024). Esta estrutura complexa não apenas contribui para a persistência da bactéria em ambientes hospitalares e dispositivos médicos, mas também facilita a transferência horizontal de genes, potencializando a aquisição de perfil de resistência MDR. O processo de formação de biofilmes em *A. baumannii* é dinâmico e multifatorial, sendo regulado por uma intrincada rede de determinantes físico-químicos e microbianos (Figura 2). Três mecanismos principais favorecem o estabelecimento de biofilmes nesta espécie: (i) a interação entre as células bacterianas (agregação); (ii) a adesão; e (iii) a troca de informações no meio circundante por *quorum sensing* (DOLMA et al., 2022).

Figura 2 -Processo de formação de Biofilme em *A. baumannii*



Fonte: adaptado de DOLMA et al. (2022)

A agregação, fundamental para a coesão do biofilme, é frequentemente mediada pela presença de polissacarídeos extracelulares. Genes como *bap* e *pga* desempenham papéis cruciais neste processo, codificando adesinas de superfície e

proteínas para a produção de exopolissacarídeo (MCCONNELL; PACHÓN, 2012). A adesão inicial das células a superfícies é um passo crítico na formação do biofilme, envolvendo não apenas estruturas específicas, mas também propriedades intrínsecas da superfície celular de *A. baumannii*. Assim, uma combinação de fatores pode influenciar esse processo, como pili e fímbrias, hidrofobicidade celular e carga eletrostática, que coletivamente determinam a capacidade da bactéria de aderir a diversos substratos. A hidrofobicidade da superfície celular é uma propriedade fundamental que influencia significativamente a capacidade de adesão de *A. baumannii*. Esta propriedade é largamente determinada pela composição da membrana externa, incluindo a presença de proteínas de membrana externa (OMPs) e a estrutura do lipopolissacarídeo (LPS). Estudos têm demonstrado que cepas de *A. baumannii* com maior hidrofobicidade celular geralmente exibem uma capacidade aumentada de formar biofilmes (ÁLVAREZ-FRAGA et al., 2016). A carga eletronegativa da superfície celular é principalmente atribuída aos grupos fosfato e carboxila presentes no LPS e em outras moléculas da superfície celular. A interação entre a carga eletronegativa da bactéria e as cargas presentes na superfície do substrato pode resultar em forças de atração ou repulsão, influenciando diretamente a eficiência da adesão inicial. Em superfícies com carga positiva, como alguns biomateriais modificados, a adesão de *A. baumannii* pode ser favorecida devido à atração eletrostática (EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018). A expressão de pili é regulada por vários genes, com destaque para o operon *csu*. Neste operon, o gene *csuE* desempenha um papel particularmente importante, codificando a subunidade da ponta do pilus, que é crucial para o reconhecimento e a ligação inicial ao substrato (GEDEFIE et al., 2021). *A. baumannii* pode modular ativamente estas propriedades em resposta a estímulos ambientais. Por exemplo, a exposição a antimicrobianos ou a condições de estresse oxidativo pode levar a alterações na expressão de OMPs e na composição do LPS, afetando tanto a hidrofobicidade quanto a carga da superfície celular. Esta plasticidade permite que *A. baumannii* se adapte rapidamente a diferentes nichos e otimize sua capacidade de adesão em diversos contextos (KARAMPATAKIS; TSERGOULI; BEHZADI, 2024).

3. Justificativa

Os antibióticos revolucionaram a medicina e, atualmente, são responsáveis por salvar milhões de vidas, tanto no tratamento de infecções quanto na viabilização de cirurgias e outros procedimentos médicos quando utilizados com fins profiláticos (MARTENS; DEMAIN, 2017). Contudo, a eficácia de muitos desses agentes tem sido comprometida pela evolução da RAM, agravada pela escassez de novas terapias antimicrobianas, o que resultou em uma crise no tratamento de doenças infecciosas (MOLCHANOVA; HANSEN; FRANZYK, 2017). Diante desse cenário, o principal desafio consiste no desenvolvimento de novas terapias direcionadas, sobretudo, ao combate de cepas bacterianas com perfis de resistência amplamente disseminados (CZAPLEWSKI et al., 2016). Esforços devem ser concentrados em identificar novas abordagens, incluindo substâncias antimicrobianas com mecanismos de ação inovadores e visando novos alvos celulares. No entanto, a maioria dos antibióticos recentemente aprovados constituem apenas variações de classes existentes, sem oferecer novas estratégias para o tratamento antibacteriano (KONG et al., 2021; THEURETZBACHER et al., 2023; VOULGARIS, 2009).

Neste contexto, complexos metálicos derivados da fendiona têm se destacado como alternativas promissoras (VIGANOR et al., 2017). Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram o potente efeito antimicrobiano de Cu-fendiona e Ag-fendiona contra cepas CRAB (VENTURA et al., 2020). Esses complexos metálicos apresentaram potente ação bactericida contra células planctônicas, com valores de CIM inferiores a 3 μ M (1,56 μ g/mL). Notavelmente, as CIMs observadas para *A. baumannii* foram pelo menos quatro vezes menores em comparação com *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, outros patógenos críticos (PEREGRINO et al., 2021; VIGANOR et al., 2015). Além da atividade contra células planctônicas, esses compostos também demonstraram capacidade significativa de inibir a formação de biofilmes e reduzir a viabilidade de biofilmes maduros de *A. baumannii*, em concentrações entre 2x e 8x CIM. A baixa toxicidade de Cu-fendiona e Ag-fendiona observada em modelos *in vivo*, como *G. mellonella* e camundongos suíços, reforça o potencial terapêutico desses compostos (MCCANN et al., 2004).

Apesar dos resultados promissores, os mecanismos moleculares pelos quais Cu-fendiona e Ag-fendiona exercem sua atividade antimicrobiana em *A. baumannii* ainda não foram elucidados. Além disso, é crucial explorar as propriedades PK/PD e

o perfil de atividade desses complexos metálicos, visando à otimização racional do seu desenvolvimento para alcançar o máximo potencial terapêutico. Compreender como esses compostos interferem na formação e estabilidade de biofilmes, bem como avaliar seus efeitos sob diferentes condições, é igualmente importante. Paralelamente, dado que *A. baumannii* possui um arsenal diversificado de fatores de virulência, além do biofilme, é relevante investigar o impacto desses complexos sobre esses mecanismos, ampliando o entendimento de seu potencial antivirulência. Assim, este trabalho busca preencher essas lacunas, proporcionando uma caracterização abrangente do potencial terapêutico dos complexos metálicos Cu-fendiona e Ag-fendiona no controle de infecções causadas por *A. baumannii*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar e avaliar a atividade de Cu-fendiona e Ag-fendiona como possíveis agentes antimicrobianos e atenuadores da virulência bacteriana.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o espectro de atividade de Cu-fendiona e Ag-fendiona;
- Obter dados microbiológicos detalhados sobre a atividade de Cu-fendiona e Ag-fendiona em *A. baumannii*;
- Determinar as propriedades farmacodinâmicas da atividade de Cu-fendiona e Ag-fendiona em *A. baumannii*;
- Avaliar o risco de desenvolvimento de resistência a Cu-fendiona e Ag-fendiona em *A. baumannii*;
- Investigar a existência de alguns atributos de virulência relacionados à patogenicidade de *A. baumannii*;
- Analisar propriedades físico-químicas da superfície celular de *A. baumannii* e sua correlação com a formação de biofilme e/ou mecanismos de virulência;
- Explorar o impacto do biofilme na virulência de *A. baumannii* e analisar seu comportamento sob diferentes condições;
- Avaliar os efeitos de Cu-fendiona e Ag-fendiona sobre os alguns atributos de virulência de *A. baumannii*;

5. Materiais e métodos

Procedimentos Gerais

5.1 Compostos

Os complexos metálicos analisados neste estudo, $[\text{Cu}(\text{fendiona})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Cu-fendiona) e $[\text{Ag}(\text{fendiona})_2]\text{ClO}_4$ (Ag-fendiona), foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Dr. Malachy McCann da *National University of Ireland Maynooth*, Irlanda. Os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de 10.000 µg/mL (solução estoque) e acondicionados a 4°C até a utilização.

5.2 Amostras bacterianas

Foram utilizadas 26 cepas clínicas de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos, amplamente caracterizadas pelo nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores. Essas cepas exibem fenótipos de resistência distintos, sendo 84,6% (22/26) classificadas como MDR (VENTURA et al., 2020). Os valores de CIM e CBM para Cu-fendiona e Ag-fendiona, previamente determinados, e os resultados estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados da atividade antimicrobiana de Cu-fendiona e Ag-fendiona em 26 cepas clínicas de *A. baumannii*

	Ag-fendiona	Cu-fendiona
CIM 90 µg/mL	1,56	1,56
MG-CIM µg/mL (µM)	1,56 (2,48)	1,56 (1,63)
CBM 90 µg/mL	3,12	3,12
MG-CBM µg/mL (µM)	2,28 (3,63)	2,22 (2,30)

Fonte: Ventura et al. (2020)

Nas metodologias abordadas na **Parte I** deste trabalho, foram utilizadas seis cepas clínicas, selecionadas com base em seus perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos e valores de CIM para carbapenêmicos e complexos derivados de fendiona, visando a formar um grupo representativo e diversificado (Tabela 2). A escolha de um grupo reduzido de cepas foi motivada pela complexidade dos métodos utilizados, visando também restringir o consumo dos complexos metálicos. Em contrapartida, os métodos incluídos na **Parte II** deste trabalho, por serem menos laboriosos e não envolverem o uso dos complexos metálicos, foram realizados com as 26 cepas clínicas.

Adicionalmente, a cepa-padrão *A. baumannii* ATCC 19606 foi incluída em todos os testes. As amostras foram recuperadas do armazenamento de longo prazo a -20°C em glicerol a 20% (v/v) por cultura em ágar sangue (AS) ou ágar nutriente (AN) com incubação a 37°C por 20-24 h.

Tabela 2 – Valores de concentração inibitória mínima de carbapenêmicos e complexos metálicos à base de fendiona em seis cepas clínicas de *A. baumannii*

	CIM MEM (µg/mL)	CIM IMP (µg/mL)	CIM Cu-fendiona (µg/mL)	CIM Ag-fendiona (µg/mL)
3B	32	128	1,56	0,78
30B	64	64	0,78	1,56
38B	16	32	1,56	1,56
78B	32	32	1,56	1,56
98B	64	64	1,56	1,56
101B	64	128	1,56	1,56
ATCC	1	1	1,56	1,56

Fonte: Ventura et al. (2020)

CIM – Concentração Inibitória Mínima; MEM – meropenem; IMP – imipenem; 3B, 30B, 38B, 78B, 98B e 101B – cepas clínicas; ATCC – cepa-padrão *A. baumannii* ATCC 19606.

5.2.1 Confirmação da identificação por MALDI-TOF/MS

A identificação de *A. baumannii* foi confirmada por meio da técnica de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo (MALDI-TOF MS, do inglês *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*). As amostras foram analisadas pelo equipamento *Microflex LT* (Bruker Daltonics, Alemanha), do Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica, no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - UFRJ, em colaboração com a Prof.^a Dra. Renata Picão.

A identificação foi realizada pelo método de transferência direta de colônia com pré-tratamento com ácido fórmico, conforme descrito por Manukumar e Umesha (2017). Brevemente, colônias bacterianas provenientes de culturas recentes foram depositadas nos alvos da placa de aço polido (*MSP 96 Target Polished Steel*, Bruker) por meio de transferência direta. O pré-tratamento com ácido fórmico a 70% (v/v) realizado e, então foi aplicada a solução matriz (HCCA; alfa-ciano-4-hidroxicinâmico). A cepa de *E. coli* DH5 α foi utilizada como padrão para calibração e espectro de referência do equipamento. O processamento dos espectros de proteínas na faixa de 2 a 20 kDa foi realizado utilizando o software *flexControl* versão 3.4 (Bruker Daltonics, Alemanha), e os dados obtidos foram comparados com a biblioteca "*MBT Compass reference*" versão 4.1.100 (Bruker Daltonics, Alemanha). Para interpretação, foram aplicados os critérios-padrão da fabricante, de modo que pontuações iguais ou superiores a 2.000 indicaram uma identificação confiável em nível de espécie.

5.2.2 Determinação da suscetibilidade às polimixinas

A CIM das polimixinas B e E (colistina) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo segundo o CLSI (do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*). As recomendações do documento M7-A10 (CLSI, 2018), que padroniza os métodos de diluição para determinação da suscetibilidade a antimicrobianos, foram rigorosamente seguidas. Resumidamente, soluções de inóculo, ajustadas para uma concentração final de $\sim 5 \times 10^5$ UFC/mL foram expostas a concentrações de 0,25 a 16 μ g/mL dos antimicrobianos diluídos em caldo Mueller Hinton com ajuste de cátions (MHB-ca). A leitura final foi realizada após incubação por 20-24h a 35°C \pm 2°C. As cepas-padrão *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram usadas como

controles de qualidade em todos os testes, realizados em pelo menos três repetições biológicas.

A interpretação dos resultados seguiu os critérios estabelecidos no documento M7-A10 (CLSI, 2018), considerando a ocorrência do fenômeno “*skipped well*” (do inglês, poços saltados) em testes de microdiluição. Assim, nos casos em que ocorreu um único “salto”, a CIM foi reportada com base na concentração maior. Contudo, testes com múltiplos saltos ou com salto de mais de um poço foram considerados não interpretáveis. As amostras com resultados válidos foram classificadas como sensíveis, resistentes intermediárias ou resistentes, de acordo com os limites estabelecidos pelo CLSI (2024).

O método de macrodiluição também foi realizado conforme as diretrizes da norma M7-A10 (CLSI, 2018), utilizando a mesma concentração de inóculo (5×10^5 UFC/mL) e uma faixa de concentrações antimicrobianas ampliada (0,25 a 64 $\mu\text{g/mL}$). As principais diferenças incluíram o uso de tubos de vidro e o volume final de 2 mL. A leitura foi feita após incubação de 20 a 24 h a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, com os mesmos controles aplicados no teste de microdiluição.

5.3 Análises estatísticas

Os testes empregados para as análises comparativas e de correlação foram: testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk) para avaliar a distribuição dos dados; teste ANOVA seguido do teste de Tukey (paramétrico) ou teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn (não-paramétrico) para análise de variância; e teste de Pearson (paramétrico) ou Spearman (não-paramétrico) para correlação. Para os ensaios de virulência em *Galleria mellonella*, curvas de sobrevivência foram traçadas utilizando o método de Kaplan-Meier, e a significância foi determinada usando o teste log-rank das curvas de sobrevivência (Kaplan e Meier, 1958). As análises dos dados foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* versão 10.3.1 (Dotmatics Ltd, Boston, EUA) e um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todos os testes.

Parte I: Determinação de parâmetros farmacodinâmicos de Cu-fendiona e Ag-fendiona

5.4 Relação exposição-resposta

Para avaliar a cinética de ação antimicrobiana de Cu-fendiona e Ag-fendiona, curvas de tempo-morte foram geradas aplicando-se concentrações de $\frac{1}{4}x$, $1x$, $4x$ e $16x$ CIM desses compostos a culturas de *A. baumannii*, de acordo com Liu e colaboradores (2021). As concentrações-alvo dos compostos foram obtidas por meio da diluição da solução estoque (100 mM) em MHB-ca. O inóculo foi obtido a partir culturas bacterianas com 24h de crescimento, suspensas em solução salina fisiológica estéril ajustadas a DO_{600} ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, as suspensões foram diluídas em MHB-ca para gerar um inóculo final de 10^6 UFC/mL. Um tubo contendo caldo, diluente e bactéria foi usado como controle. As culturas contendo as diferentes concentrações dos compostos, assim como o controle, foram incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$; após 3, 6, 9, 12 e 24 h, alíquotas de cada cultura foram coletadas e diluídas de forma seriada em solução salina fisiológica estéril e, três gotas de 20 μL de cada diluição foram semeadas em ágar Mueller-Hinton (MHA) por meio da técnica de microgota, de acordo com Nikolic, Mudgil e Whitehall (2020), modificada a partir do proposto por Miles, Misra e Irwin (1938). As placas foram, então, incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 20-24h e, após esse período, realizada a contagem das colônias. de cada gota. A estimativa final de UFC foi obtida pela média aritmética das três gotas, multiplicadas pelo fator de diluição apropriado. Curvas foram plotadas com os logaritmos decimais (\log_{10}) de UFC/mL em função do tempo (h), apresentando-se uma curva distinta para cada concentração do composto.

5.5 Fracionamento de doses

A investigação da cinética de ação antimicrobiana dos compostos sob concentrações flutuantes, ou seja, em múltiplas dosagens, foi realizada de acordo com o proposto por Silva (2009), com modificações. Para tal, cepas selecionadas foram incubadas na presença de Cu-fendiona ou Ag-fendiona em concentração equivalente à $\frac{1}{2}x$ CIM de cada cepa, sob o volume final de 200 μL . Foi aplicado um inóculo final

de 10^6 UFC/mL, obtido a partir de suspensão bacteriana preparada em solução salina fisiológica estéril ajustada para $DO_{600} 0,1 \pm 0,1$ ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL) e posteriormente diluída em MHB-ca. Por se tratar de um procedimento de múltipla dosagem, após 6h de incubação, 200 μ L de solução correspondente a 1x CIM dos compostos foram adicionados (reaplicação) para que a dose aplicada correspondesse a 0,5x CIM. Em tempos fixos de 0, 3, 6, 9, 12 e 24 h, alíquotas de 10 μ L de cada cultura foram coletadas, diluídas seriadamente em solução salina fisiológica estéril e semeadas de acordo com a técnica de microgota, conforme descrito anteriormente. Os resultados foram representados graficamente com valores de \log_{10} de UFC/mL em função do tempo.

5.6 Efeito pós-antibiótico

O efeito pós-antibiótico (EPA) dos compostos à base de fendiona foi determinado de acordo com a metodologia descrita por D'Atanasio e colaboradores (2020), com adaptações. Culturas bacterianas na fase de crescimento logarítmico foram expostas por 1h a concentrações de 1x, 5x e 10x CIM de cada composto diluídos em MHB-ca, com volume final de 1 mL, e incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Para a obtenção das culturas em fase logarítmica foi utilizada uma solução de inóculo em solução salina fisiológica estéril com turbidez ajustada $DO_{600} 0,1 \pm 0,1$ ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL). Após o período de incubação inicial, procedeu-se a remoção do composto por meio da diluição de 1:1000 (v/v) em novo meio MHB-ca. Essa diluição foi determinada por conservar um número de microrganismos suficientes para permitir um crescimento secundário, ao mesmo tempo em que reduz a concentração do composto a níveis subinibitórios, de modo a não interferir no crescimento bacteriano. As culturas diluídas foram novamente incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por mais 5h. Controles de crescimento foram aplicados simultaneamente para cada cepa em MHB-ca sem adição de composto.

A contagem de colônias viáveis foi realizada imediatamente após a adição de composto (T-1h), imediatamente antes e após a remoção do composto (T0h₁ e T0h₂) e a cada hora após a remoção do composto (T1h, T2h, T3h, T4h e T5h). Nesses intervalos, alíquotas de 10 μ L de cada cultura foram coletadas, diluídas seriadamente em solução salina fisiológica estéril e semeadas de acordo com a técnica de microgota, conforme descrito anteriormente. Os valores obtidos permitiram gerar curvas representativas da retomada de crescimento das amostras, demonstrada pelos

valores de \log_{10} de UFC/mL em função do tempo. As contagens bacterianas abaixo do limite de detecção (100 UFC/mL) foram plotadas como 100 UFC/mL. O EPA é expresso pela seguinte fórmula matemática (MACKENZIE; GOULD, 1993): $EPA = T - C$, em que T representa o tempo necessário para que a cultura-teste cresça 1 \log_{10} , em relação à contagem efetuada logo após a diluição ($T0h_2$); C representa o tempo necessário para que a cultura controle cresça 1 \log_{10} , em relação à contagem efetuada logo após a diluição ($T0h_2$).

5.7 Impacto do inóculo sobre a CIM

O efeito da concentração do inóculo sobre os valores da CIM dos compostos metálicos Cu-fendiona e Ag-fendiona foi investigado conforme descrito por Jangra et al. (2019). Inicialmente, a padronização do inóculo foi realizada correlacionando a turbidez das suspensões bacterianas com a respectiva contagem de UFC. Em seguida, o efeito da concentração do inóculo sobre a CIM foi avaliado, incubando as cepas selecionadas na presença de Cu-fendiona ou Ag-fendiona, com concentrações variando de 0,78 a 50 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações-alvo dos compostos foram obtidas a partir da diluição da solução estoque (10.000 $\mu\text{g/mL}$) em MHB-ca, alcançando a maior concentração (50 $\mu\text{g/mL}$), seguida de diluições seriadas para atingir as demais concentrações. Para cada cepa, foram utilizadas cinco concentrações de inóculo distintas (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/mL), obtidas a partir de culturas bacterianas com 24 h de crescimento. Essas culturas foram inoculadas em solução salina fisiológica estéril, ajustando a turbidez para uma DO600 de $0,25 \pm 0,01$ ($\sim 1 \times 10^9$ UFC/mL). Em seguida, 20 μL dessa solução foram adicionados a cada poço, com volume final de 200 μL , resultando em um inóculo final de aproximadamente 5×10^8 UFC/mL. As demais concentrações de inóculo foram obtidas por diluição seriada de 1:10 (v/v) a partir da suspensão inicial. As microplacas foram incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 20-24 h. Após a incubação, 20 μL de rezasurina foram adicionados a todos os poços e a placa foi reincubada por mais 1 h. A mudança de cor nos poços foi observada e os valores de CIM foram definidos como a menor concentração na qual nenhuma mudança de cor no poço foi observada. Foram realizados três experimentos independentes, e a concentração da suspensão de inóculo inicial foi confirmada, pelo menos uma vez, por meio da semeadura utilizando a técnica de microgota, conforme descrito anteriormente.

5.8 Potencial de desenvolvimento de resistência

A presença de tolerância e heterorresistência foi investigada por meio do teste de disco-difusão modificado, também conhecido como “TDtest” (Teste de Detecção de Tolerância, do inglês *Tolerance Detection Test*), adaptado de Gefen et al. (2017). Discos estéreis de papel de filtro (6 mm de diâmetro) foram preparados e posteriormente impregnados com 5 µL de solução de Ag-fendiona ou Cu-fendiona a 1000 µg/mL. A concentração dos compostos de fendiona aplicada aos discos foi determinada após uma avaliação preliminar dos halos produzidos por diferentes concentrações. Após secagem ao ar, os discos contendo os complexos à base de fendiona foram posicionados em placas de MHA previamente inoculadas com as cepas do estudo ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) utilizando um swab estéril. Após 24 h de incubação a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, período durante o qual formaram-se halos inibitórios ao redor dos discos, estes foram removidos e substituídos por novos discos de papel impregnados com 5 µL de solução estéril de glicose a 40%. As placas foram reincubadas por mais 24 h nas mesmas condições e examinadas para verificar o crescimento de colônias dentro da zona de inibição. Além disso, os diâmetros dos halos formados após ambas as incubações foram medidos e comparados. Por fim, a CIM de Ag-fendiona e Cu-fendiona foi determinada para as subpopulações isoladas dentro da zona de inibição usando o método de microdiluição em caldo, conforme o protocolo de Viganor et al. (2015). Foram incluídas duas repetições biológicas nos testes.

Parte II: Investigação de Determinantes de virulência em *A. baumannii*

5.9 Determinação de fenótipo mucoide

Para a determinação do fenótipo mucoide, as cepas bacterianas foram cultivadas em AS e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h, assegurando o crescimento de colônias bem definidas para análise morfológica subsequente. As colônias bacterianas foram então submetidas a inspeção visual para uma avaliação qualitativa, considerando aspectos como: tamanho (pequeno, médio ou grande) e viscosidade (baixa, média ou alta). Após a caracterização da morfologia colonial, as culturas bacterianas em AS foram submetidas ao teste de hipermucoviscosidade (“*string test*”), conforme descrito por Fang et al. (2004). Assim, com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril, uma única colônia bacteriana foi tocada e estendida verticalmente. Cepas que formaram um fio viscoso com comprimento ≥ 5 mm foram consideradas positivas no teste. O comprimento do fio foi estimado visualmente, utilizando uma régua milimetrada como referência. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes, nos quais a cepa *K. pneumoniae* ATCC 13883 foi utilizada como controle positivo de fenótipo hipermucoide e “*string test*” positivo.

5.10 Atividade hemolítica

A presença de atividade hemolítica foi investigada em AS (5% de sangue de carneiro estéril), de acordo com o protocolo descrito por Davies e colaboradores (2016). Alíquotas de 5 μL de suspensões bacterianas em caldo de lisogenia (LB), provenientes de culturas em fase estacionária (20-24 h), ajustadas a uma $\text{DO}_{600} 0,1 \pm 0,1$ ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL), foram pontualmente inoculadas nas placas contendo AS, incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h. Os resultados foram determinados por inspeção visual dos halos hemolíticos ao redor das colônias, seguida da medição dos halos observados, após 24 e 48 h de incubação. *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo, enquanto *A. baumannii* ATCC 19606, classificado como não-hemolítico por Bouvet e Grimont (1986), foi utilizado como controle negativo. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes.

5.11 Motilidade de superfície

Os ensaios para a detecção da motilidade de superfície foram realizados em ágar LB semissólido (0,3% de ágar), preparado no mesmo dia da utilização, segundo o protocolo descrito por Dahdouh et al. (2016) com adaptações. Suspensões bacterianas em meio LB, obtidas de forma idêntica à descrita no item anterior, foram utilizadas para inocular pontualmente o centro das placas, sob volume de 1 µL, fornecendo um inóculo final de $\sim 10^5$ UFC. Após incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h, as placas foram visualmente inspecionadas para determinação da motilidade e os diâmetros das zonas de difusão, quando observados, foram medidos. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes, nos quais a cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle positivo.

5.12 Propriedades da superfície celular

Duas propriedades da superfície celular bacteriana foram avaliadas nesse conjunto de experimentos: (a) hidrofobicidade (HSC); (b) eletronegatividade, estimada pelo potencial Zeta (pZ). A HSC foi mensurada utilizando o ensaio de adesão a hidrocarbonetos (MATH) descrito por Rosenberg, Gutnick e Rosenberg (1980), com adaptações. Células bacterianas, cultivadas em meio LB por 20-24 h, foram coletadas por centrifugação a $10.000\times g$ por 5 minutos, lavadas e ressuspendidas em tampão fosfato-salino (PBS) 1X. As suspensões foram então ajustadas para uma concentração final de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL, correspondente a uma DO_{600} de $0,1 \pm 0,01$ (DO inicial). Alíquotas de 1,2 mL da suspensão celular foram misturadas a 0,3 mL de n-octano, seguido de agitação em vórtex por 120 segundos. Após 15 minutos de repouso, amostras da fase aquosa foram cuidadosamente recolhidas e sua DO_{600} determinada (DO final). Todas as leituras foram realizadas em triplicata, sendo utilizado como controle branco a solução PBS 1X com n-octano, preparado da mesma forma que as suspensões bacterianas. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados. A HSC foi estimada pelo cálculo da porcentagem de células aderidas ao octano, por meio da fórmula: $\text{HSC} (\%) = [(\text{DO inicial} - \text{DO final}) / \text{DO inicial}] \times 100$. Os resultados foram interpretados como: baixa HSC (0-20%); moderada HSC (20-80%); e alta HSC (80-100%).

O pZ foi medido no equipamento *NanoBrook-Omni Particle Size and Zeta Potential Analyzer* (Brookhaven Instruments Corp., EUA), no Laboratório intermediário de Biofísica de Fungos - UFRJ, em colaboração com a prof. Dra. Susana Frasés Carvajal. Células bacterianas na fase estacionária (20-24 h), provenientes de culturas em meio LB, foram coletadas por centrifugação a 10.000x g por 5 minutos, lavadas três vezes e ressuspendidas em uma solução-base. Três soluções foram testadas inicialmente para determinar a mais adequada para os experimentos subsequentes: solução de NaCl 1 mM (pH 6) estéril, água destilada estéril e água ultrapura. Assim, as análises definitivas foram realizadas com suspensões bacterianas em água ultrapura, contendo $\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL ($DO_{600} 0,1 \pm 0,01$). O pZ foi calculado com base na mobilidade eletroforética das partículas utilizando o modelo de Smoluchowski. Todas as medições foram obtidas em pelo menos dois experimentos independentes, com 10 ciclos distintos por experimento.

5.13 Formação de biofilme em substratos distintos

A capacidade de formação de biofilme foi avaliada pelo método de coloração com violeta de cristal, conforme descrito por Qi et al. (2016), com pequenas adaptações. Suspensões bacterianas em solução salina fisiológica estéril ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/mL) foram adicionadas a placas de microtitulação de poliestireno (PS) contendo meio LB fresco, diluídas na proporção de 1:20, resultando em um inóculo final de $\sim 5 \times 10^6$ UFC/mL. Os substratos testados incluíram PS não-coberto e PS coberto com poli-L-lisina (PLL). Após 24 h de incubação a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, as placas foram lavadas três vezes e os poços corados com cristal violeta (CV) a 0,3% por 15 minutos à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas para remover o excesso de corante, e o CV residual foi solubilizado com 200 μL de etanol a 70% contendo 10% de álcool isopropílico. A DO_{600} de cada poço foi medida para quantificar a formação de biofilme. A cepa ATCC 19606 foi utilizada como referência e meio LB não inoculado como controle negativo.

A classificação do biofilme foi feita comparando a média de leitura de DO dos poços teste (DO_t) com a DO "cut-off" (DO_c), conforme STEPANOVIĆ et al. (2000). O valor de DO_c foi calculado pela fórmula: $DO_c = \text{média de DO do controle negativo} + (3 \times \text{DP do controle negativo})$. Os resultados foram utilizados para classificar o biofilme em quatro categorias: não aderente ($DO_t \leq DO_c$), fracamente aderente ($DO_c < DO_t \leq$

2x DOc), moderadamente aderente ($2x DOc < DOt \leq 4x DOc$) e fortemente aderente ($DOt > 4x DOc$). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com ao menos três repetições biológicas.

Os revestimentos de PLL foram preparados conforme Verschoor et al. (1990), aplicando-se uma solução de 0,1% de PLL em água nos poços das microplacas por 30 minutos a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, seguida de remoção da solução não adsorvida e lavagem da superfície com água estéril.

5.14 Autoagregação

A habilidade de autoagregação foi avaliada de acordo com o método descrito por Collado, Meriluoto e Salminen (2008), com adaptações. Inicialmente, as cepas bacterianas foram cultivadas em meio LB a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação a $10.000x g$ por 10 minutos, lavadas duas vezes e suspensas em PBS 1X. As suspensões bacterianas, ajustadas a uma DO_{600} de $0,12 \pm 0,03$ ($\sim 5 \times 10^8$ UFC/mL), foram transferidas para tubos de vidro, agitadas em vórtex por 15 segundos e incubadas à temperatura ambiente por 6 h. No início do ensaio e a cada 2 h, alíquotas de 200 μL da porção superior dos tubos foram recolhidas para leitura da DO_{600} , em triplicata. O percentual de autoagregação foi calculado segundo Kos et al. (2003), a partir da fórmula: $A(\%) = 1 - (A_t / A_0) \times 100$, em que A_t corresponde à absorbância nos tempos analisados ($t = 2, 4, \text{ ou } 6 \text{ h}$) e A_0 à absorbância inicial ($t = 0$). Pelo menos 2 ensaios independentes foram realizados para cada cepa.

5.15 Virulência em modelo de *Galleria mellonella*

Os procedimentos de infecção larval seguiram o protocolo de Ramarao et al. (2012), com aplicação de um inóculo de 10^5 UFC por larva. Brevemente, 10 μL de inóculo, ajustado para 10^7 UFC/mL, foram injetados diretamente na hemocele das larvas através de uma abertura na base do último par de pseudópodes, utilizando-se uma seringa de insulina. O inóculo foi preparado a partir de culturas em fase exponencial, com células bacterianas recolhidas, lavadas e suspensas em PBS 1X estéril. Como controles negativos, foram utilizados grupos de larvas não inoculadas e

larvas inoculadas com 10 μ L de PBS 1X. As larvas foram dispostas em placas de Petri com discos de papel de filtro e incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro, sendo monitoradas quanto à pigmentação e mortalidade a cada 24 h, durante 96 h pós-infecção. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental (n = 20 larvas por experimento). Os dados combinados de três experimentos independentes foram utilizados para gerar as curvas de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier, com análise das diferenças entre as curvas pelo teste de Log-rank.

6. Resultados

6.1 Amostras bacterianas

6.1.1 Confirmação da identificação por MALDI-TOF/MS

Todas as 26 cepas clínicas incluídas nesse estudo foram identificadas como *A. baumannii* por meio da análise de MALDI-TOF MS. Diferentes padrões de resultado foram obtidos, mas todos obedeceram aos critérios do fabricante para a obtenção de uma identificação a nível de espécie de alta-confiabilidade. Espectros de coincidência para outras espécies do complexo *Acinetobacter-baumannii-calcoaceticus* (Abc) foram frequentemente observados entre os 10 espectros de maior coincidência, até mesmo com scores de alta confiabilidade (≥ 2.0), como observado para a espécie *A. nosocomialis* em oito (30,78%) cepas.

6.1.2 Determinação da suscetibilidade às polimixinas

As 26 cepas clínicas foram submetidas à avaliação de suscetibilidade à polimixina B e à colistina por meio do método de microdiluição em caldo. Os valores de CIM obtidos nas três repetições biológicas foram classificados como interpretáveis ou não-interpretáveis, conforme os critérios estabelecidos pelo CLSI (documento M7-A9, 2018), considerando a elevada frequência com que detectamos o fenômeno de “*skipped wells*”. Assim, os valores finais de CIM atribuídos a cada cepa foram baseados em dois resultados interpretáveis e com valores concordantes, isto é, idênticos ou variando em uma diluição. Resultados conclusivos foram obtidos para 15 cepas em relação à colistina e 20 cepas em relação à polimixina B. A Tabela 3 apresenta as faixas de variação de CIM, as médias geométricas das CIMs (MG-CIM), além dos valores de CIM capazes de inibir o crescimento de 50% (CIM 50) e 90% (CIM 90) das cepas, considerando apenas os resultados conclusivos. A MG-CIM da polimixina B foi ligeiramente superior à da colistina, consistindo em 1,4 $\mu\text{g/mL}$ e 1,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Resistência à colistina foi detectada em 6,67% (1/15) das cepas, enquanto resistência intermediária foi detectada em 13,33% (2/15). Em relação à polimixina B, 10% (2/20) das cepas foram classificadas como resistentes e 40% (8/20) apresentaram resistência intermediária.

Tabela 3 – Perfil de suscetibilidade às polimixinas das cepas de *A. baumannii* com resultados conclusivos por meio da microdiluição em caldo

	Colistina (n=15)	Polimixina B (n=20)
Varição da CIM ($\mu\text{g/mL}$)	0,5-8	0,5-4
MG-CIM ($\mu\text{g/mL}$)	1,044	1,438
CIM 50 ($\mu\text{g/mL}$)	1	2
CIM 90 ($\mu\text{g/mL}$)	2	2
R (%)	6,67	10
I (%)	13,33	40

Fonte: a autora (2024)

CIM: Concentração Inibitória Mínima; MG-CIM: Média Geométrica da CIM; CIM 50: Concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento de 50% das cepas testadas; CIM 90: Concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas testadas; R (Resistência) (%): Percentual de cepas que apresentam resistência ao antibiótico; I (Resistência Intermediária) (%): Percentual de cepas que apresentam resistência intermediária ao antibiótico.

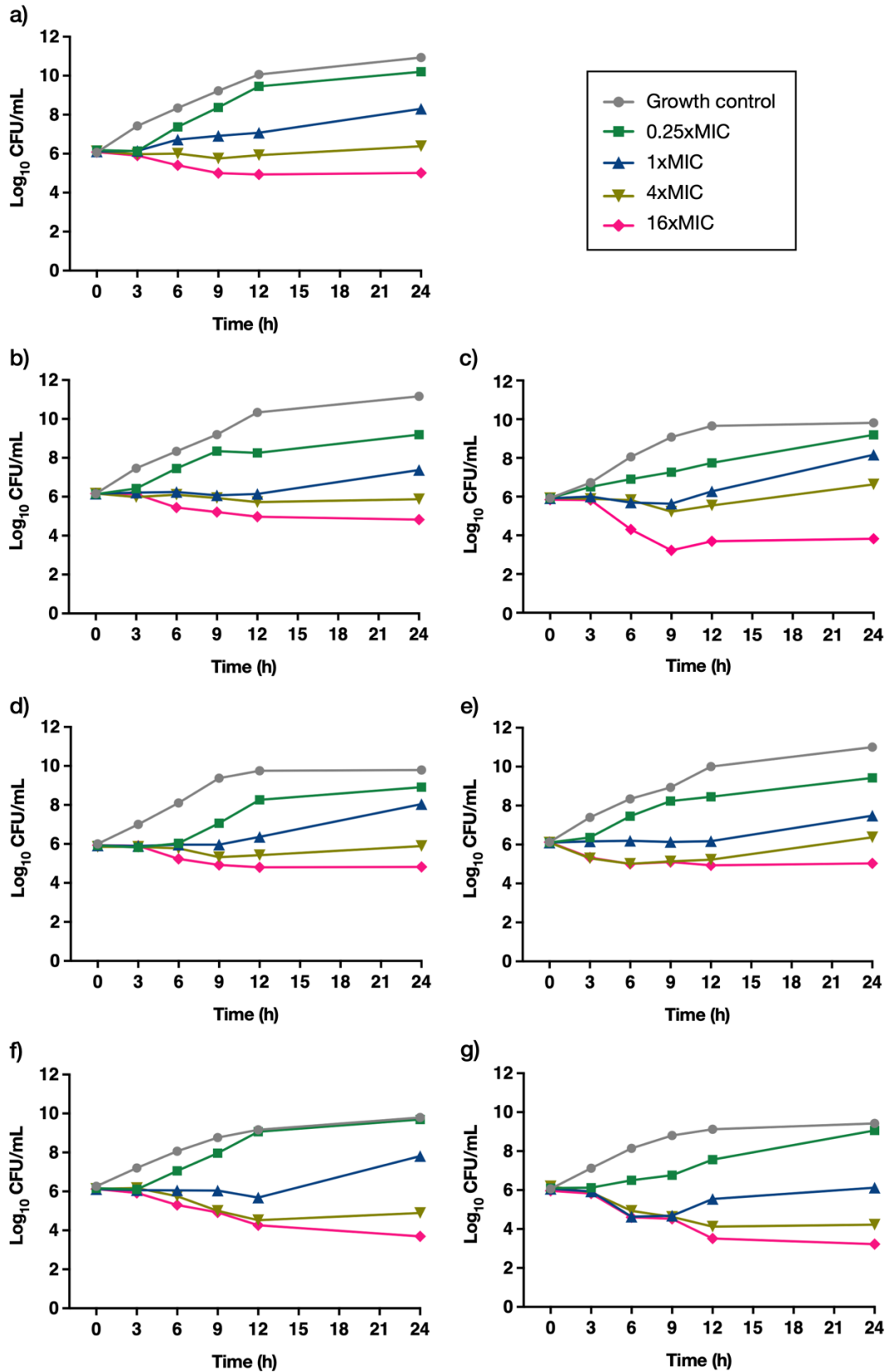
Resultados inconclusivos, caracterizados pela ocorrência consistente do fenômeno de "skipped wells" ou alta variabilidade entre as replicatas, foram observados em 11 cepas para colistina e em seis para polimixina B. Além disso, as seis amostras que apresentaram resultados inconclusivos para polimixina B também exibiram o mesmo padrão para colistina. Entre as cepas exibindo resultados não-interpretáveis para a colistina no método de microdiluição, cinco foram testadas pelo método de macrodiluição, em tubos de vidro, uma vez que esse material promove uma menor adsorção dos polipeptídeos, em comparação com o poliestireno das placas de microtitulação. Os resultados obtidos foram concordantes com os da microdiluição em quatro amostras, que exibiram crescimento com saltos de concentração e, portanto, mantiveram sua suscetibilidade indefinida à colistina. A amostra restante teve o valor de CIM confirmado na faixa de suscetibilidade (1 $\mu\text{g/mL}$).

Parte I: Determinação de parâmetros farmacodinâmicos de Ag-fendiona e Cu-fendiona

6.2 Relação exposição-resposta

Os perfis de atividade antimicrobiana de Ag-fendiona e Cu-fendiona foram avaliados a partir de curvas de exposição-resposta utilizando concentrações equivalentes a 0,25x, 1x, 4x e 16x CIM. Os resultados mostraram uma redução consistente no crescimento bacteriano, em concentrações a partir da CIM, para ambos os compostos, destacando sua atividade bactericida (Figuras 3 e 4). O pico de atividade foi observado entre 6 e 12 h, com efeitos sustentados até o final do teste (24 h) na maioria das cepas, sobretudo nas concentrações mais altas. Cu-fendiona alcançou uma redução de aproximadamente 3 log nas concentrações de 1x, 4x e 16x CIM. Ag-fendiona exibiu uma redução semelhante nas concentrações de 1x e 4x CIM, mas demonstrou uma resposta notadamente mais potente na concentração de 16x CIM, observando-se uma redução superior a 5 log. Embora tenham sido consistentemente demonstradas reduções de crescimento em concentrações a partir de 1x CIM, suas taxas não foram afetadas de forma linear pela concentração do composto, especialmente nas horas iniciais do teste.

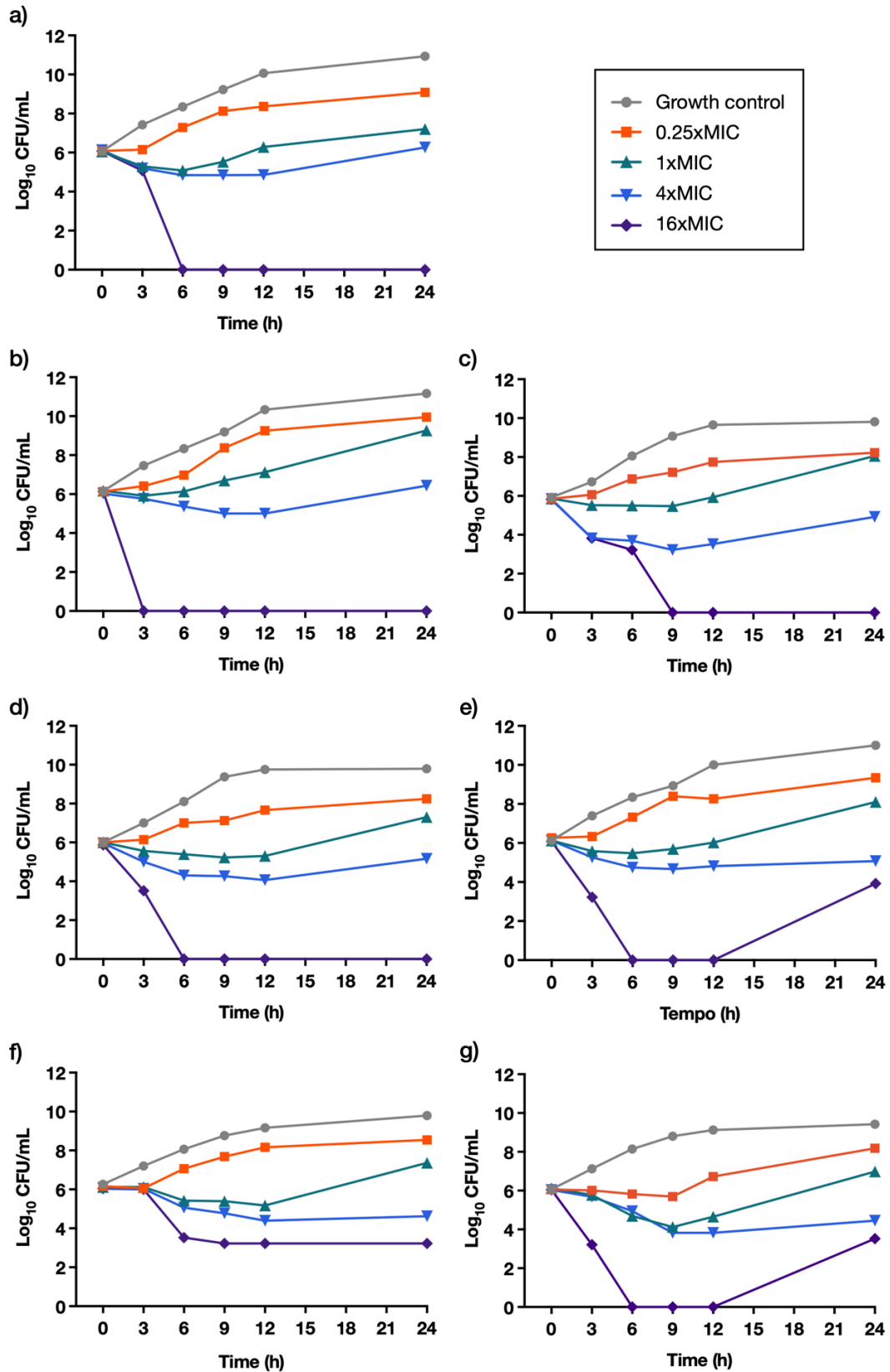
Figura 3 – Curvas de exposição-resposta produzidas pelos efeitos de Cu-fendiona em seis cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa de referência ATCC 19606



Fonte: a autora (2024)

a) 3B; b) 30B; c) 38B; d) 78B; e) 98B; f) 101B; g) ATCC 19606. O limite de detecção do ensaio foi de 100 UFC/mL.

Figura 4 – Curvas de exposição-resposta produzidas pelos efeitos de Ag-fendiona em seis cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa de referência ATCC 19606



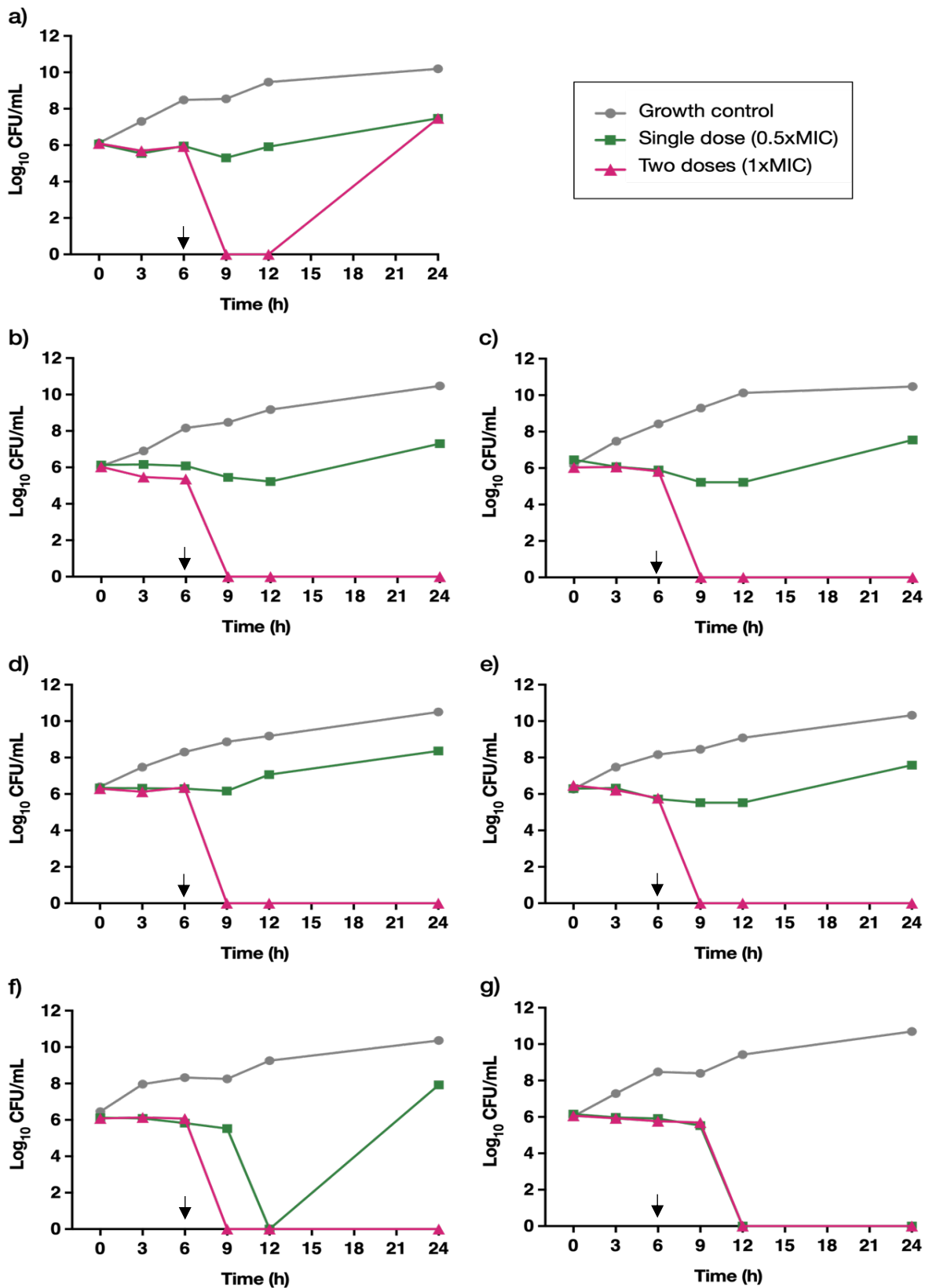
Fonte: a autora (2024)

a) 3B; b) 30B; c) 38B; d) 78B; e) 98B; f) 101B; g) ATCC 19606. O limite de detecção do ensaio foi de 100 UFC/mL.

6.3 Fracionamento de doses

Para investigar os efeitos de um hipotético fracionamento de dose, experimentos de tempo-morte foram realizados com um esquema de tratamento equivalente a 1x CIM dos compostos, dividido em duas doses com concentração equivalente a 0,5 x CIM, administradas em um intervalo de 6 h. Os resultados revelaram um efeito bactericida potente tanto para Cu-fendiona, quanto para Ag-fendiona, após a reaplicação dos compostos (Figuras 5 e 6). Em todas as cepas testadas, observou-se uma rápida redução da população bacteriana (acima de 3 log UFC/mL), atingindo níveis não detectáveis (<100 UFC/mL) em 3 h após a administração da segunda dose (9 h após a primeira dose) para a maioria das cepas. As exceções foram a cepa 101B para Cu-fendiona, e as cepas 38B e 78B para Ag-fendiona, em que a atividade bactericida foi obtida 6 h após a reaplicação. Este efeito bactericida persistiu até o final do experimento em seis das sete cepas (86%) para ambos os compostos, com apenas a cepa 3B exibindo recrescimento. A eficácia do fracionamento de doses foi particularmente notável para Cu-fendiona, quando comparados os resultados entre o controle de dose única e a aplicação de duas doses.

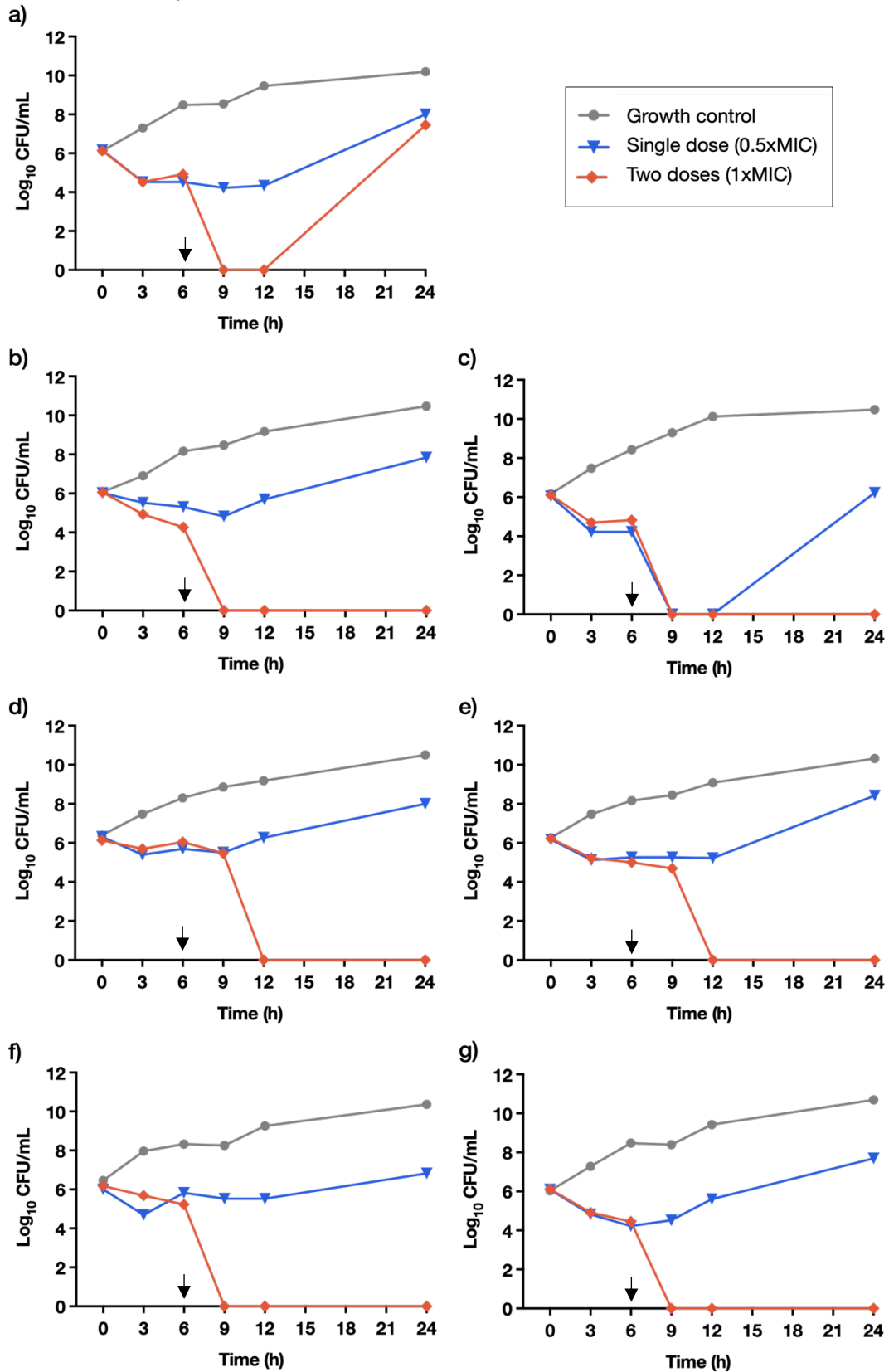
Figura 5 - Efeitos do fracionamento de doses de Cu-fendiona em seis cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa de referência ATCC 19606



Fonte: a autora (2024)

a) 3B; b) 30B; c) 38B; d) 78B; e) 98B; f) 101B; g) ATCC 19606. O limite de detecção do ensaio foi de 100 UFC/mL; as setas indicam o momento da reaplicação.

Figura 6 - Efeitos do fracionamento de doses de Ag-fendiona em seis cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa de referência ATCC 19606



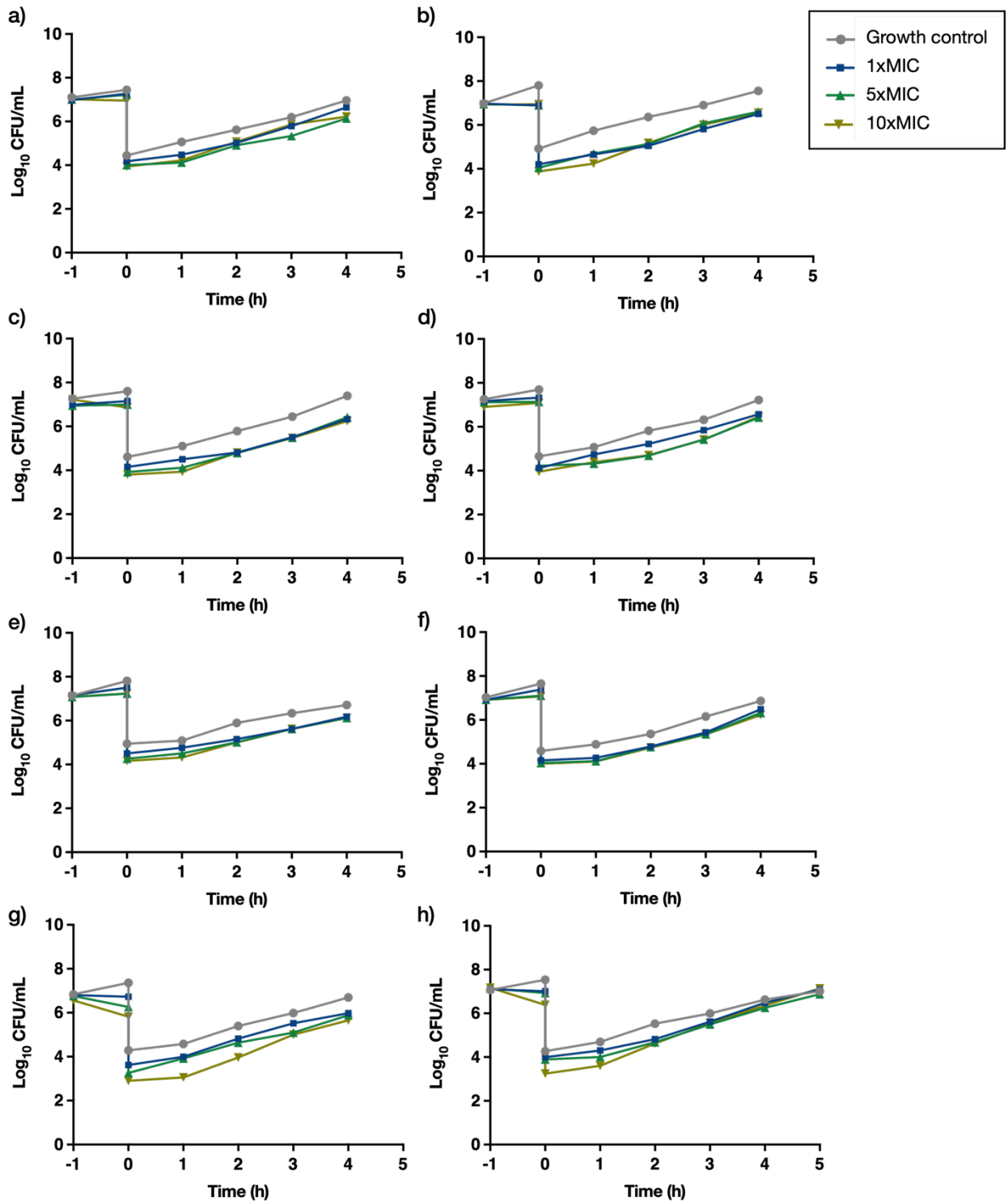
Fonte: a autora (2024)

a) 3B; b) 30B; c) 38B; d) 78B; e) 98B; f) 101B; g) ATCC 19606. O limite de detecção do ensaio foi de 100 UFC/mL; as setas indicam o momento da reaplicação.

6.4 Efeito pós-antibiótico

A duração do EPA foi calculada a partir dos dados das curvas de 5x MIC, considerada a concentração bactericida ótima, utilizando a fórmula descrita. Os resultados indicaram a presença de EPA para ambos os compostos, embora com durações relativamente curtas. Foram obtidos valores médios de duração de EPA para Ag-fendiona e Cu-fendiona de $1,86 \pm 0,38$ h e $0,71 \pm 0,49$ h, respectivamente. Embora a duração média do EPA para Ag-fendiona tenha sido apenas 1,14 h superior à de Cu-fendiona, a análise das curvas revelou diferenças significativas nas dinâmicas de recrescimento dos dois compostos (Figuras 8 e 9). Curvas de EPA também foram geradas para os antimicrobianos clássicos meropenem (MEM) (Figura 8H) e ciprofloxacino (CIP) (Figura 9H) com a cepa-padrão, visando estabelecer parâmetros comparativos que permitissem uma avaliação mais precisa dos perfis de EPA exibidos pelos complexos metálicos estudados. A análise demonstrou que a dinâmica de recuperação do crescimento para Cu-fendiona se assemelhou à de MEM, enquanto Ag-fendiona exibiu um comportamento similar ao de CIP. Ainda a partir da análise das curvas, foi possível confirmar a ínfima atividade concentração-dependente de Cu-fendiona, agindo de forma muito similar ao MPM, um antibiótico reconhecido por efeito tempo-dependente. Também foi corroborada a relação mais forte dos efeitos de Ag-fendiona com a concentração, demonstrada pela inibição do recrescimento de forma concentração-dependente, similarmente à curva de CIP. Esse padrão de resposta reforça a presença mútua de atividade concentração e tempo-dependente para Ag-fendiona, como estabelecido na literatura para CIP.

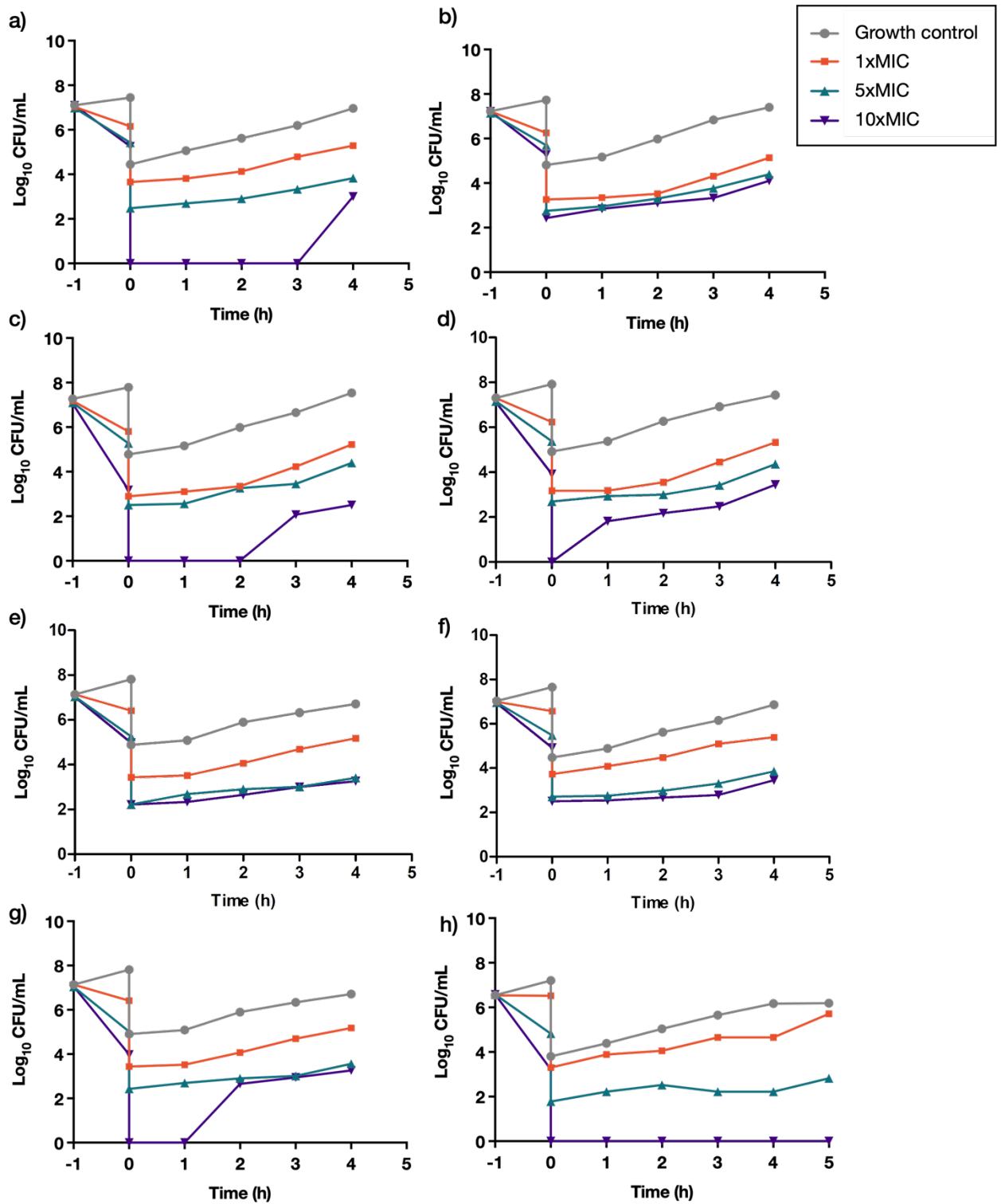
Figura 8 - Efeito pós-antibiótico induzido pela exposição de 1 hora a Cu-fendiona em seis cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa de referência ATCC 19606



Fonte: a autora (2024)

a) 3B; b) 30B; c) 38B; d) 78B; e) 98B; f) 101B; g) ATCC 19606; h) MEM (ATCC 19606). O limite de detecção do ensaio foi de 100 UFC/mL.

Figura 9 - Efeito pós-antibiótico induzido pela exposição de 1 hora a Ag-fendiona em seis cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa de referência ATCC 19606



Fonte: a autora (2024)

a) 3B; b) 30B; c) 38B; d) 78B; e) 98B; f) 101B; g) ATCC 19606 h) CIP (ATCC 19606). O limite de detecção do ensaio foi de 100 UFC/mL.

6.5 Impacto do inóculo sobre a CIM

O efeito de inóculo sobre a CIM de Cu-fendiona e Ag-fendiona foi investigado por meio de microdiluição em caldo e os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 4 e 5. Foi demonstrado que o aumento das concentrações de inóculo não afetou proporcionalmente os valores de CIM (Figura 7). Mesmo com o aumento de 100 vezes na UFC, o valor da CIM permaneceu inalterado em todas as 6 cepas clínicas e apenas dobrou na cepa-padrão, indicando um efeito inibitório forte e consistente mesmo sob altas cargas bacterianas. Ressaltamos a natureza progressiva dos incrementos de inóculo, ou seja: de 10^4 para 10^5 UFC/mL são acrescidas ≈ 90.000 UFC, enquanto de 10^5 para 10^6 UFC/mL, o acréscimo corresponde a ≈ 900.000 UFC, e assim sucessivamente. Dessa forma, elevações mais significativas de CIM foram observadas nos maiores incrementos de inóculo, como esperado. Ainda assim, o incremento final acumulado, que equivale a aproximadamente $9,99 \times 10^7$ UFC/mL (de 10^4 para 10^8 UFC/mL), elevou os valores de CIM em, no máximo, $2,34 \mu\text{g/mL}$ (de $0,78$ a $3,12 \mu\text{g/mL}$) para todas as cepas tratadas com Ag-fendiona e $85,7\%$ ($6/7$) das cepas com Cu-fendiona. Por fim, considerando os dois compostos testados, a concentração de $3,12 \mu\text{g/mL}$ ($3,2 \mu\text{M}$ para Cu-fendiona e $5 \mu\text{M}$ para Ag-fendiona) foi capaz de erradicar mais de 98% de todos os inóculos testados.

Tabela 4 – Valores de CIM de Cu-fendiona para seis cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa-padrão ATCC 19606 com inóculos de 10^4 a 10^8 UFC/mL

CIM Cu-fendiona ($\mu\text{g/mL}$)						
	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Aumento final
3B	0,78	0,78	0,78	1,56	3,12	2,34
30B	0,78	0,78	0,78	1,56	3,12	2,34
38B	0,78	0,78	0,78	1,56	3,12	2,34
78B	0,78	0,78	0,78	1,56	6,25	5,47
98B	0,78	0,78	0,78	1,56	3,12	2,34
101B	0,39	0,39	0,39	0,78	1,56	1,17
ATCC	0,78	1,56	1,56	3,12	3,12	2,34

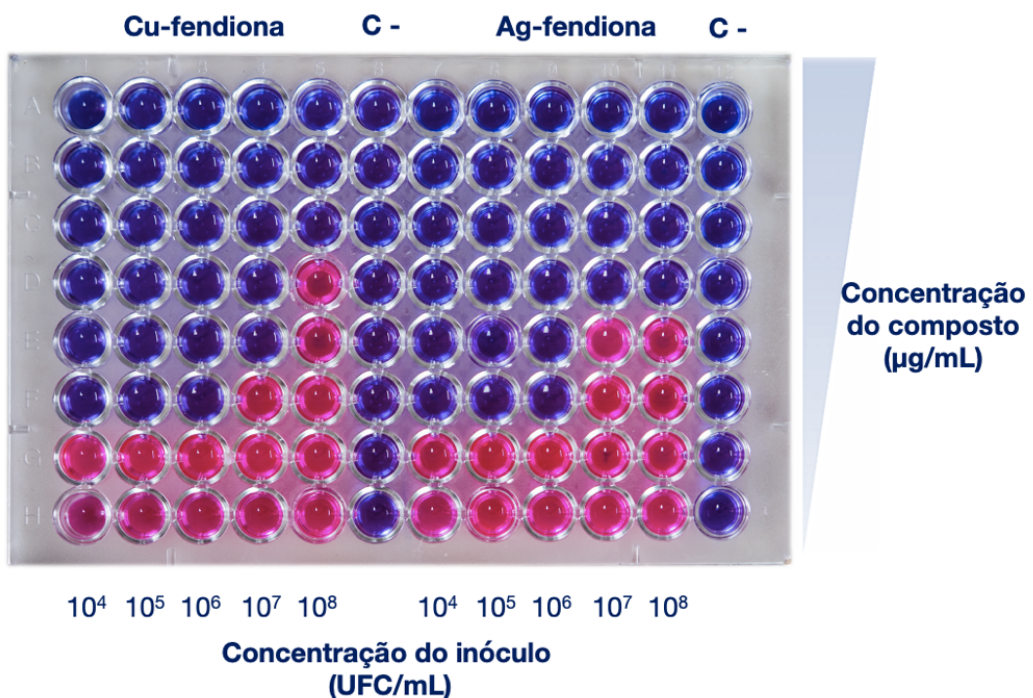
Fonte: a autora (2024)

Tabela 5 – Valores de CIM de Ag-fendiona para seis cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa-padrão ATCC 19606 com inóculos de 10^4 a 10^8 UFC/mL

CIM Ag-fendiona ($\mu\text{g/mL}$)						
	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	Aumento final
3B	0,78	0,78	0,78	1,56	3,12	2,34
30B	0,78	0,78	0,78	1,56	3,12	2,34
38B	0,78	0,78	0,78	1,56	3,12	2,34
78B	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	0,78
98B	0,78	0,78	0,78	0,78	1,56	0,78
101B	0,39	0,39	0,39	0,78	1,56	1,17
ATCC	0,78	0,78	1,56	1,56	3,12	2,34

Fonte: a autora (2024)

Figura 7 – Placa de microtitulação exemplificando leitura de teste de CIM de Cu-fendiona e Ag-fendiona em *A. baumannii*, com inóculos de 10^4 a 10^8 UFC/mL, utilizando corante rezasurina



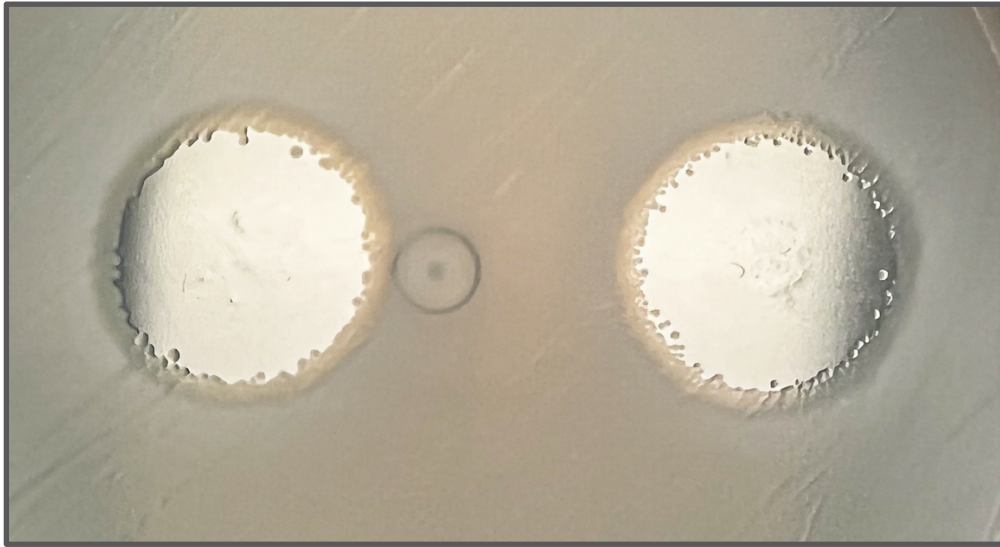
Fonte: a autora (2024)

6.6 Potencial de desenvolvimento de resistência

O potencial para ocorrência de fenômenos de recalcitrância a Cu-fendiona e Ag-fendiona foi avaliado nas seis cepas clínicas utilizando o “TDtest”. Diâmetros de halo de inibição entre 16 e 21 mm foram observados para ambos os compostos nas primeiras 24 h do teste. Após a segunda incubação, com a substituição do disco contendo o complexo metálico pelo disco de glicose, foi notada uma redução mínima (1 mm) ou ausência de redução no diâmetro do halo. Para confirmar os resultados observados, o teste foi conduzido nas demais amostras bacterianas da coleção inicial, totalizando 26 cepas clínicas. A inclusão dessas amostras visou aumentar as chances de detectar a recalcitrância antimicrobiana, que pode ocorrer em baixa frequência entre populações bacterianas. Além disso, como o “TDtest” foi recentemente estabelecido e passou por adaptações significativas em nosso estudo, particularmente na preparação dos discos com os complexos metálicos à base de fendiona, validar os resultados com um número maior de cepas foi crucial. Os resultados com as cepas adicionais foram semelhantes aos achados iniciais, com diâmetros de halo de inibição variando de 16 a 23 mm com mínima redução ou ausente até o final do período de incubação (48 h).

Em relação ao crescimento de colônias no interior da zona de inibição, não foi identificado um padrão consistente que indicasse a presença do fenômeno de tolerância, conforme descrito por Gefen et al. (2017). No entanto, colônias isoladas foram observadas recorrentemente próximas à borda do crescimento confluyente após as primeiras 24 h de incubação, um padrão detectado em pelo menos uma repetição biológica para 23 cepas com Cu-fendiona e 15 cepas com Ag-fendiona (Figura 10). Apesar da substituição dos discos antimicrobianos pelos discos de glicose, não houve alteração no número de colônias nas 24 h subsequentes, sendo apenas observado um aumento no tamanho das colônias pré-formadas.

Figura 10 – Análise do crescimento de colônias isoladas em ensaio de “TDtest” com complexos metálicos derivados da fendiona



Fonte: a autora (2024)

Com o objetivo de aprofundar a investigação do potencial de desenvolvimento de resistência aos complexos à base de fendiona, a cepa de referência ATCC 19606 foi testada pelo método de passagens sequenciais. As culturas bacterianas expostas a concentrações crescentes de Cu-fendiona e Ag-fendiona foram capazes de crescer em concentrações ligeiramente superiores à CIM. Contudo, a determinação da CIM nas cepas derivadas indicou valores equivalentes aos das cepas parentais, concordando com os resultados do teste do “TDtest”.

Parte II: Investigação de Determinantes de virulência em *A. baumannii*

6.7 Fenótipo mucoide

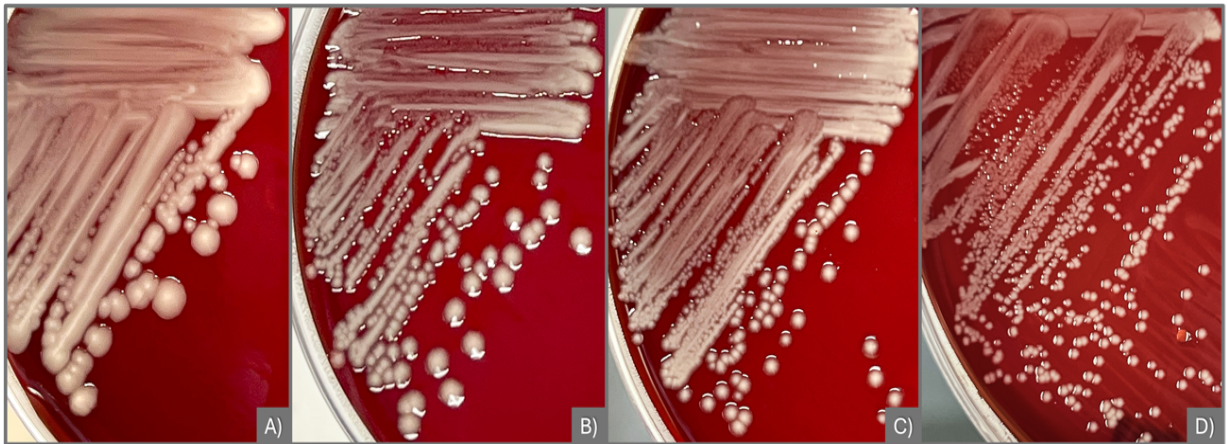
Entre as 26 cepas clínicas analisadas, foram identificados diferentes tipos morfológicos, variando em tamanho e nível de mucosidade, com uma cepa classificada como hipermucoide (Figura 11). De modo geral, as colônias do fenótipo mucoide apresentaram uma textura viscosa, aspecto brilhante e bordas mais irregulares, apesar de manterem o formato arredondado. Colônias adjacentes frequentemente se fundiam, dificultando a obtenção de colônias completamente isoladas. Em contraste, as cepas não-mucoides apresentaram colônias pequenas, com aparência mais seca e fosca, convexas, de formato bem arredondado e com bordas bem definidas, sendo facilmente isoladas (Figura 12). Seis cepas (23,1%) mostraram alto grau de mucosidade, embora não fossem classificadas como hipermucoides. Das demais, 16 (61,54%) exibiram mucosidade moderada e três (11,54%) foram consideradas não-mucoides (baixa mucosidade).

Figura 11 - Fenótipo hipermucoide: caracterização morfológica da cepa clínica 30B



Fonte: a autora (2024)

Figura 12 – Caracterização fenotípica colonial de cepas clínicas de *A. baumannii*, demonstrando diversidade morfológica e de níveis de mucosidade



Fonte: a autora (2024)

A) 97B; B) 92B; C) 78B; D) 106B. Características coloniais: nível de mucosidade - alta (A), média (B,C) e baixa (D); Tamanho – grande (A,B), média (C), pequena (D).

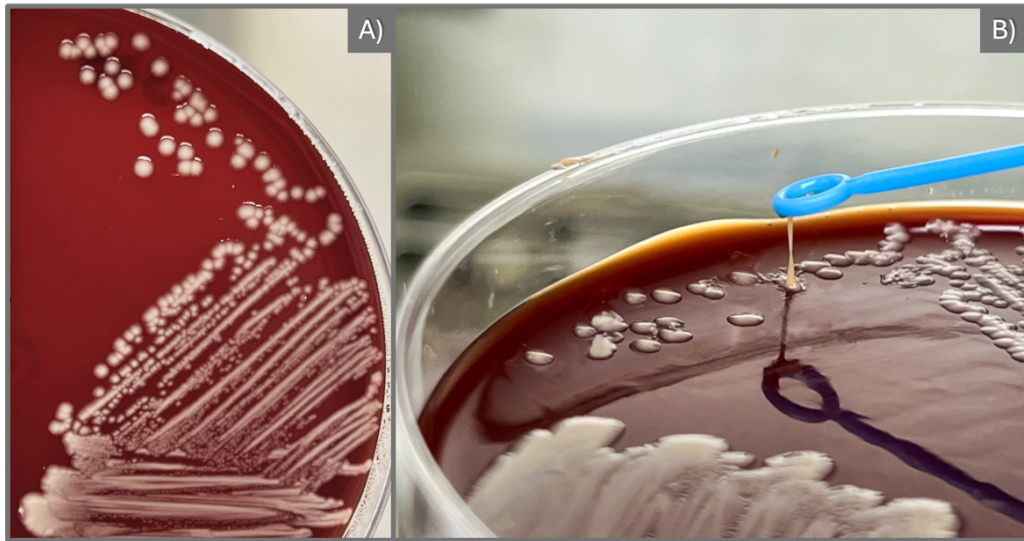
Nenhuma cepa apresentou resultado positivo no "*string test*", ainda que a formação de cordões viscosos menores que 5 mm tenha sido observada (Tabela 6). A cepa hipermucoide (30B) formou cordões com mais de 4 mm, com uma média de $4,4 \pm 0,14$ mm. No entanto, não foi observada correlação direta entre o grau de mucosidade e o comprimento do cordão. Entre as cepas com alta mucosidade, duas (109B e 117B) formaram cordões com médias próximas a 4 mm, enquanto outras duas (97B e 98B) formaram cordões com comprimento entre 1 e 1,5 mm, e as duas restantes (24B e 25B) não formaram cordões. Curiosamente, duas cepas de mucosidade moderada (37B e 38B) foram capazes de formar cordões longos, similar ao da cepa hipermucoide, com médias de $4,25 \pm 0,35$ mm e $3,93 \pm 0,90$ mm, respectivamente (Figura 13). A cepa padrão *A. baumannii* ATCC 19606 apresentou fenótipo não-mucoide e "*string test*" negativo.

Tabela 6 – Classificação morfológica de 26 cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa-padrão ATCC 19606, de acordo com nível de mucosidade, análise do “string test” e dimensões coloniais

Cepa	Mucosidade	String (mm)	Tamanho
3B	Média	2,65	M
8B	Baixa	1	P
22B	Média	0,5	M
24B	Alta	0	G
25B	Alta	1,5	M
30B	Hipermucoide	4,4	G
37B	Média	4,25	M
38B	Média	3,93	M
57B	Média	1,5	M
71B	Média	1,43	M
76B	Média	1,5	M
78B	Média	0,25	G
80B	Média	0,5	G
92B	Média	0	M
96B	Baixa	1,75	P
97B	Alta	1,5	G
98B	Alta	1,25	G
99B	Média	2,25	M
101B	Média	0	G
102B	Média	0,33	G
106B	Baixa	2,43	P
108B	Média	1,6	M
109B	Alta	3,9	M
111B	Baixa	0,125	P
117B	Alta	4,25	M
125B	Baixa	1,93	P
ATCC	Baixa	0,25	P

Fonte: a autora (2024)

Figura 13 – Formação de cordões viscosos no “string test” evidenciando uma correlação não-linear com o fenótipo mucoide



Fonte: a autora (2024)

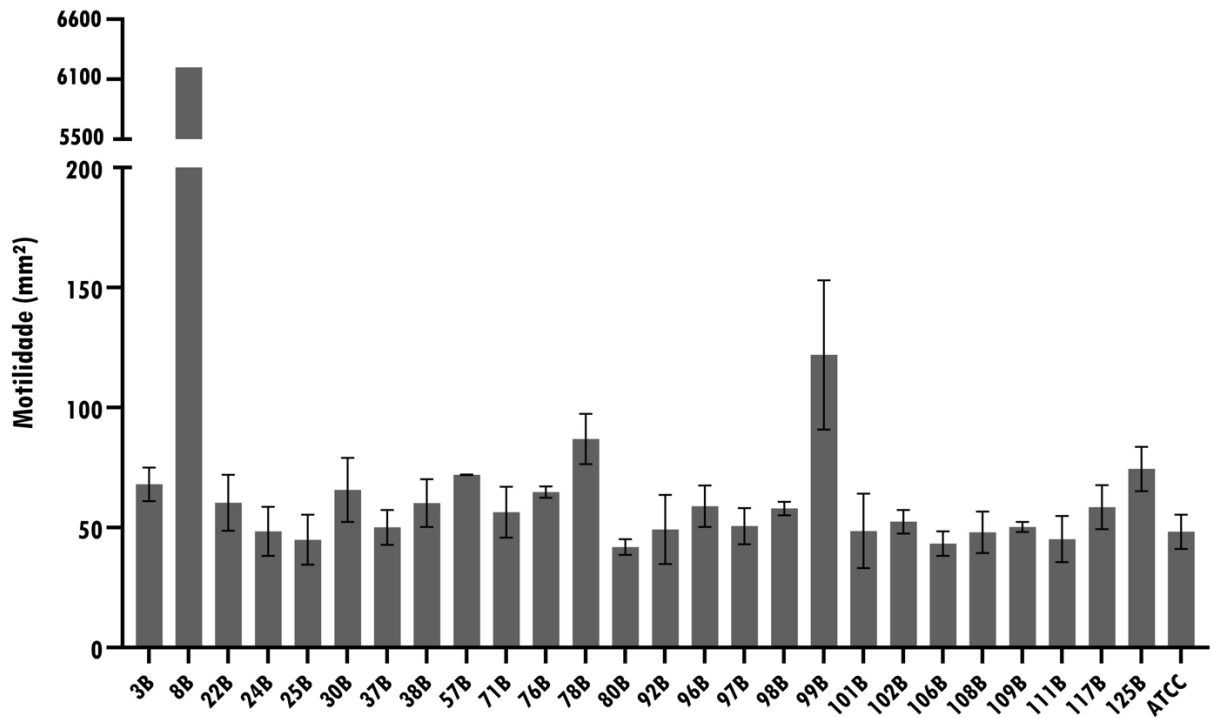
6.8 Atividade hemolítica

A presença de atividade hemolítica foi investigada por meio do teste de hemólise em ágar e não foi observada a formação de halos hemolíticos em nenhuma das 26 cepas testadas, com resultados consistentes em todas as repetições biológicas, sugerindo a ausência de produção de hemolisinas nas cepas avaliadas.

6.9 Motilidade de superfície

A capacidade de motilidade do tipo "swarming" (superficial) foi investigada nas cepas de *A. baumannii* utilizando meio semissólido (ágar LB 0,3%), e as áreas de deslocamento bacteriano na superfície do meio foram visualmente estimadas com o auxílio de uma régua. Os resultados, demonstrados pela da média da área de movimentação de cada cepa em duplicata experimental e em três repetições biológicas indicaram a ausência de motilidade significativa para a vasta maioria das cepas, que exibiram áreas médias menores que 100 mm² (Figura 14). A cepa 99B exibiu motilidade moderada, com área média de 122,0 ± 31,1 mm², enquanto a cepa 8B exibiu motilidade pronunciada, sendo capaz de migrar por toda a área da placa (~8.000 mm²) a partir do ponto central de inoculação, de forma semelhante a tentáculos ramificados (Figura 15).

Figura 14 – Avaliação quantitativa da motilidade de superfície de 26 cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa-padrão ATCC 196060



Fonte: a autora (2024)

Figura 15 - Fenótipo hiper móvel em cepa clínica de *A. baumannii* evidenciando formação de estruturas ramificadas em meio semissólido

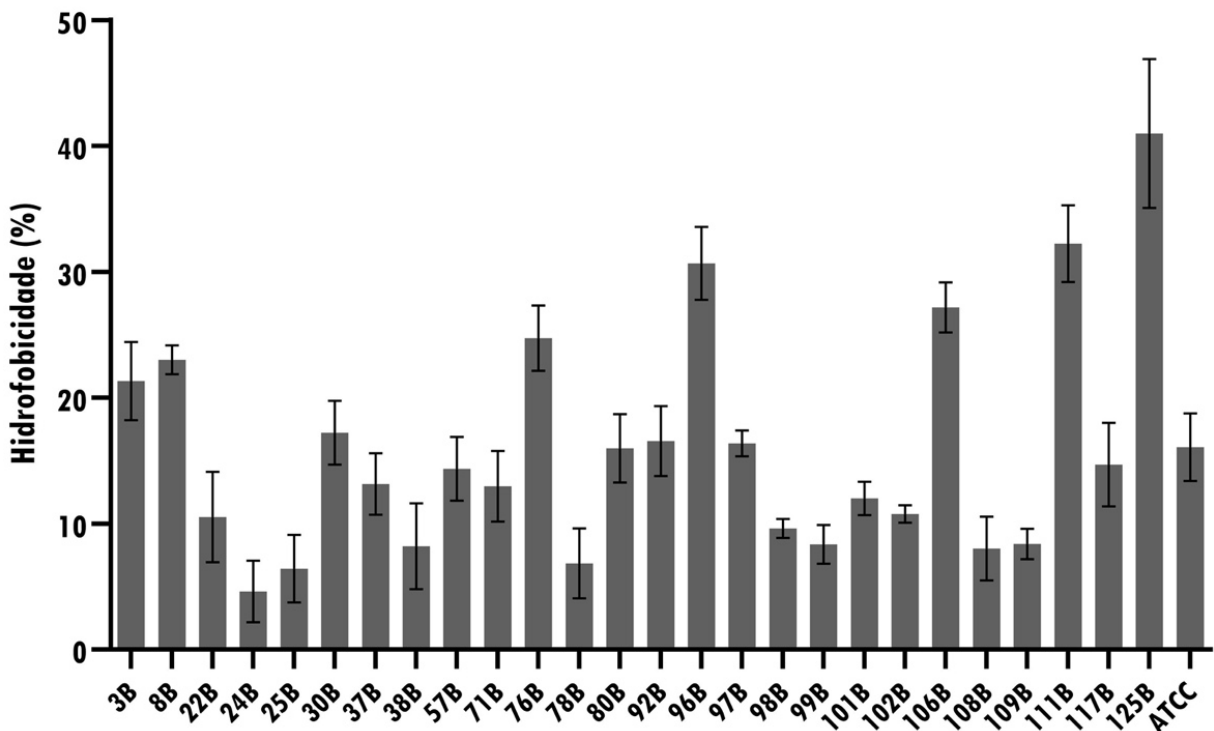


Fonte: a autora (2024)

6.10 Propriedades da Superfície Celular

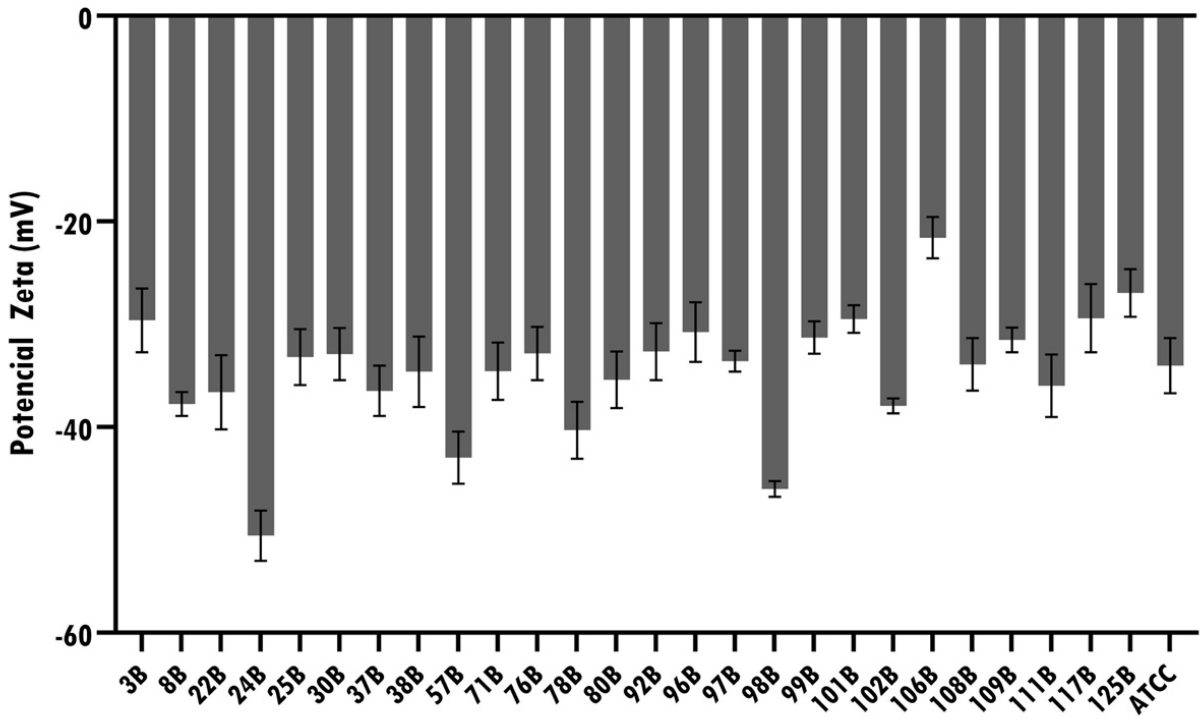
Duas propriedades da superfície celular de *A. baumannii* foram determinadas: a HSC e o pZ. Os resultados obtidos pelo ensaio MATH indicaram que a maioria das cepas possui uma afinidade discreta por hidrocarbonetos líquidos, com valores médios de HSC variando entre 4,6% e 41% (Figura 16). Sete cepas (26,9%) apresentaram HSC moderada, enquanto as 19 cepas restantes (73,1%) exibiram baixa HSC. Comparando os níveis de mucosidade (alta, média e baixa), constatou-se que a HSC foi significativamente maior nas cepas com baixa mucosidade ($P < 0,0001$; ANOVA unidirecional com teste post-hoc de Tukey). Os resultados da análise do pZ revelaram que todas as cepas exibem carga superficial eletronegativa, com valores variando amplamente entre as cepas, de -21,6 mV a -46 mV (Figura 17). Foi observada uma correlação significativa, embora de intensidade fraca, entre os valores de HSC e pZ ($r = 0,425$, $p = 0,0272$; teste de correlação de Spearman) (Figura 18).

Figura 16 – Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de 26 cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa-padrão ATCC 19606



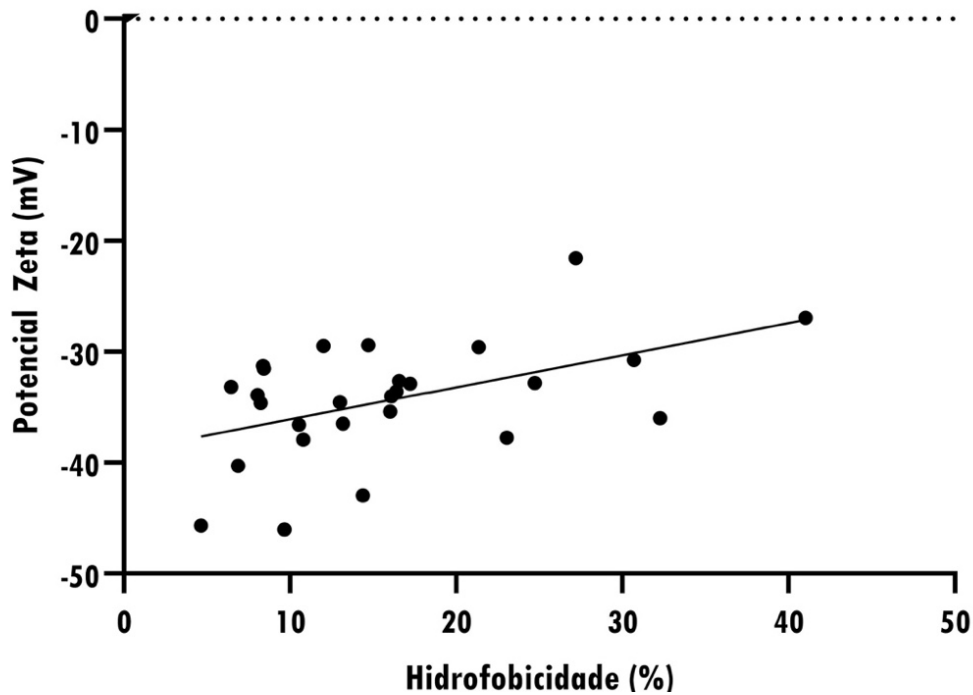
Fonte: a autora (2024)

Figura 17 – Determinação do potencial Zeta em 26 cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa-padrão ATCC 19606 como estimativa da carga da superfície celular



Fonte: a autora (2024)

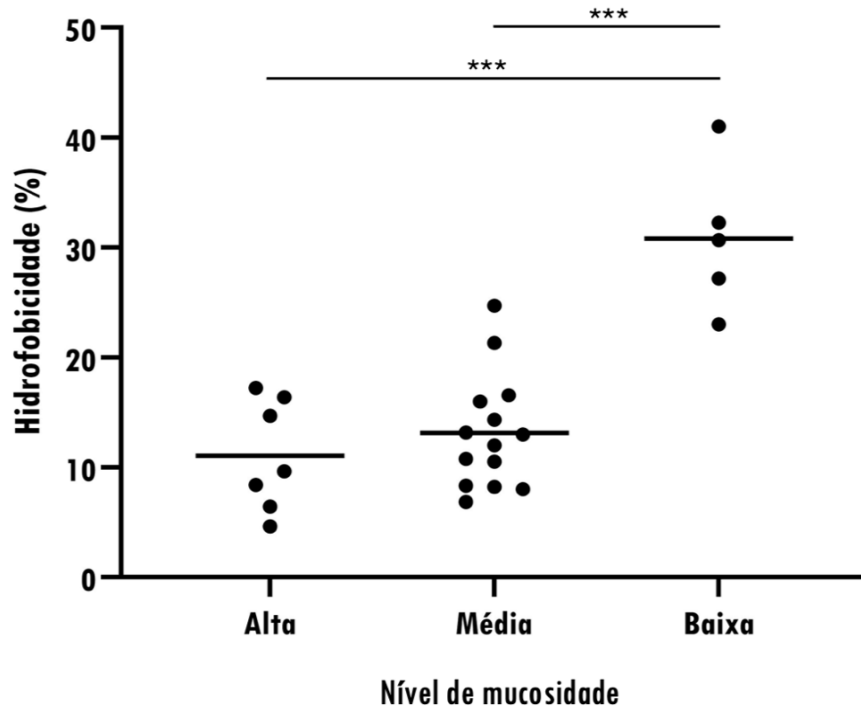
Figura 18 - Correlação entre a hidrofobicidade da superfície e o potencial Zeta de células de *A. baumannii*



Fonte: a autora (2024)

Além disso, foi identificada uma diferença significativa nos percentuais de HSC ao comparar cepas com diferentes níveis de mucosidade (Figura 19). Cepas classificadas com baixa mucosidade apresentaram valores de HSC significativamente menores em relação às cepas com mucosidade média ($p < 0,001$) e alta ($p < 0,0001$).

Figura 19 – Distribuição dos valores de hidrofobicidade da superfície celular conforme o grau de mucosidade em 26 cepas clínicas de *A. baumannii*

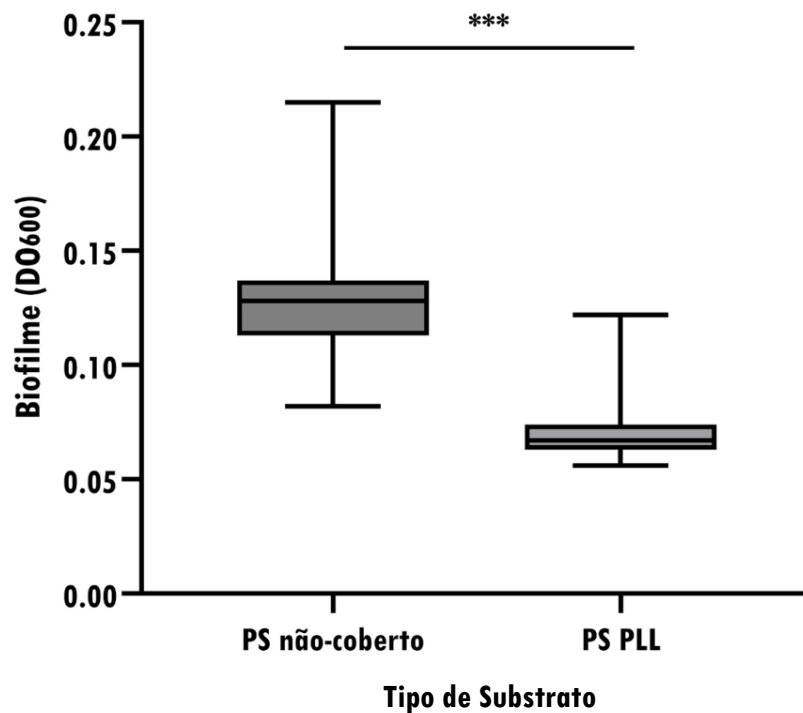


Fonte: a autora (2024)

6.11 Formação de biofilme em substratos distintos

A habilidade de formação de biofilme foi avaliada em dois substratos diferentes: PS não-coberto e PS coberto com PLL (PS-PLL). Os resultados indicaram a presença de fenótipos distintos de produção de biofilme entre as cepas, com a maioria delas (80,7%) classificadas como produtoras de biofilme fracamente aderente e cinco cepas (19,3%) formadoras de biofilme com aderência moderada, em substrato convencional de PS não-coberto. De forma interessante, foram observadas variações significativas na intensidade do biofilme formado entre os substratos testados ($p < 0,0001$; teste *t-student*). Biofilmes mais aderentes foram formados em PS não-coberto, em comparação com PS-PLL, que apresentou níveis de biofilme próximos ao controle negativo, com média de DO_{600} de $0,061 \pm 0,011$ entre as cepas testadas (Figura 20).

Figura 20 – Análise comparativa da formação de biofilme em poliestireno (PS) não-coberto e PS coberto com poli-L-lisina (PLL) entre 26 cepas clínicas de *A. baumannii*



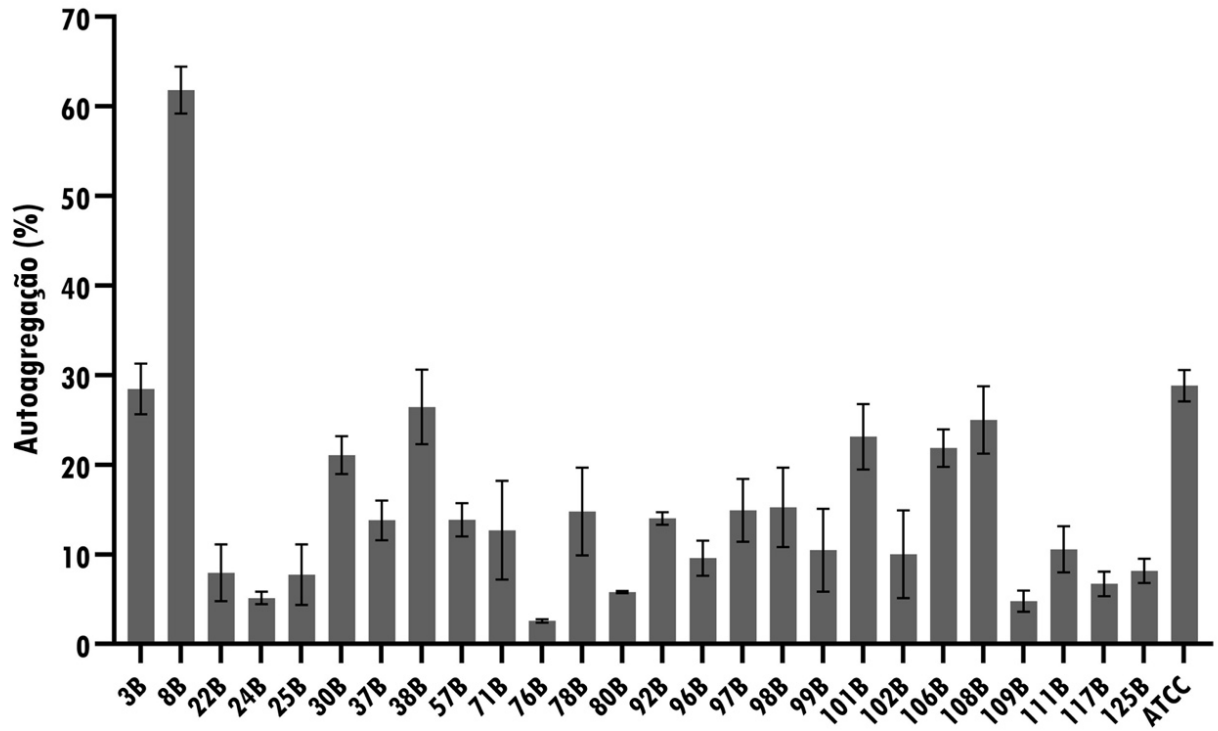
Fonte: a autora (2024)

Ainda, as análises conjuntas dos resultados de formação de biofilme em PS não-coberto, de HSC e de pZ não revelaram correlações diretas entre o fenótipo do biofilme e essas duas propriedades da superfície celular, que poderiam influenciar a formação de biofilme em superfícies abióticas.

6.12 Autoagregação

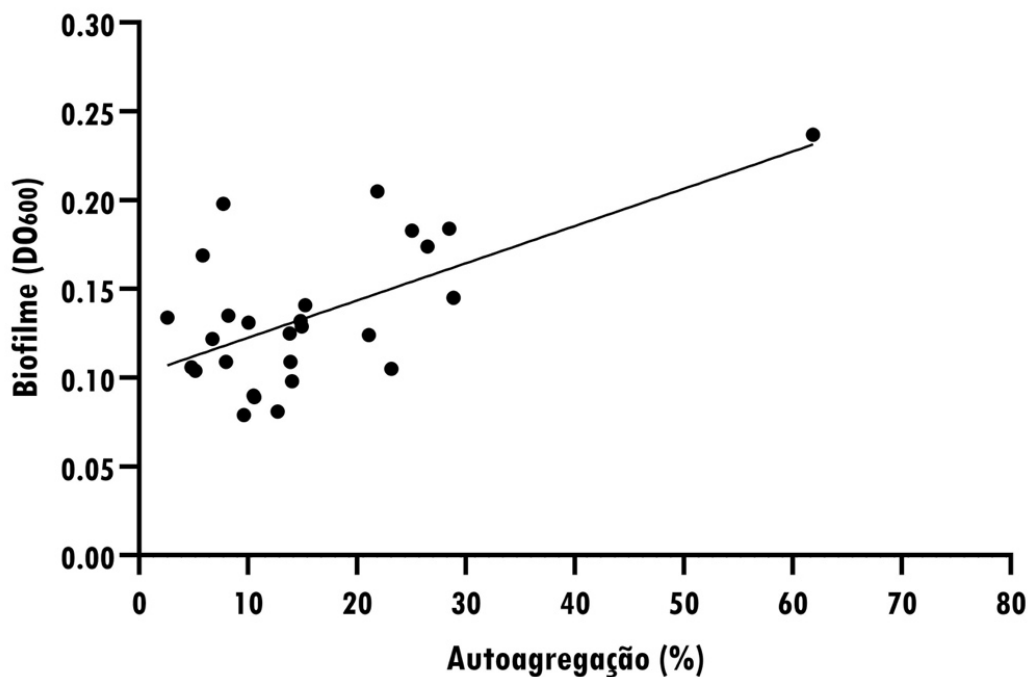
A taxa de sedimentação das cepas clínicas de *A. baumannii* foi mensurada por um período de 6 h, como indicador da capacidade de autoagregação. Os resultados revelaram a presença de diferentes níveis de autoagregação, com índices entre 2,6% e 61,8% (Figura 21). A maioria das cepas (~73%) apresentou baixa capacidade autoagregativa, com médias inferiores a 20%. No entanto, sete cepas (26,9%) exibiram índices superiores a 20%, destacando-se a cepa 8B, que apresentou capacidade de autoagregação média de $61,84 \pm 2,61\%$. Foi demonstrada uma correlação significativa, embora de intensidade fraca, entre a habilidade autoagregativa e a formação de biofilme entre as cepas ($r = 0,4024$, $p = 0,0375$; teste de correlação de Spearman) (Figura 22).

Figura 21 – Percentual de autoagregação de 26 cepas clínicas de *A. baumannii* e a cepa-padrão ATCC 19606



Fonte: a autora (2024)

Figura 22 – Correlação entre a formação de biofilme e o grau de autoagregação em 26 cepas clínicas de *A. baumannii*

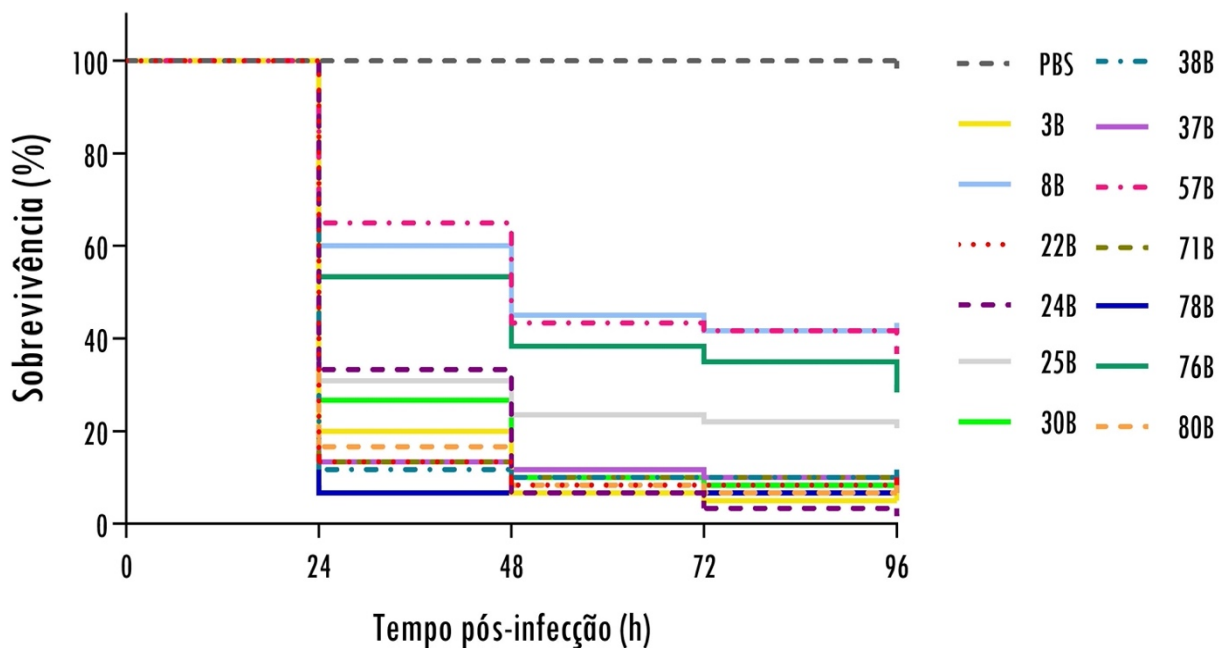


Fonte: a autora (2024)

6.13 Virulência em modelo de *Galleria mellonella*

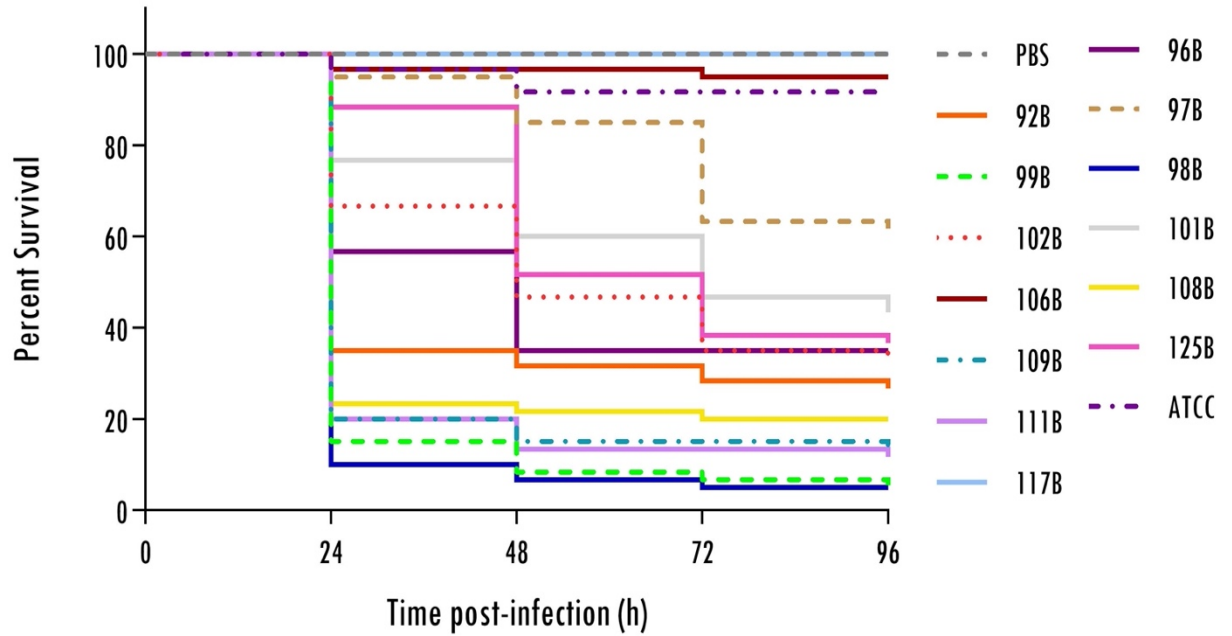
O modelo invertebrado de *G. mellonella* foi empregado para avaliar o grau de virulência das cepas de forma integral, utilizando um inóculo de 10^5 UFC. Os resultados foram divididos em dois gráficos para melhor visualização, sendo apresentadas 13 cepas clínicas na Figura 23 (3B a 80B) e outras 13 cepas clínicas (92B a 125B) mais a cepa ATCC 19606 na Figura 24. Em ambos os gráficos, PBS foi utilizado como controle. A maioria das cepas testadas exibiu uma elevada taxa de mortalidade larval, com 88,5% (23/26) apresentando taxas de sobrevivência inferiores a 50%. Entre essas, 15 (57,7%) cepas demonstraram virulência extremamente alta, causando mortalidade superior a 80%. As mortes ocorreram majoritariamente nas primeiras 48 horas após a infecção, com as taxas de sobrevivência tendendo a estabilizar após esse período.

Figura 23 - Taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com inóculo de *A. baumannii* em concentração de 10^5 UFC (n=13, cepas de 3B a 80B)



Fonte: a autora (2024)

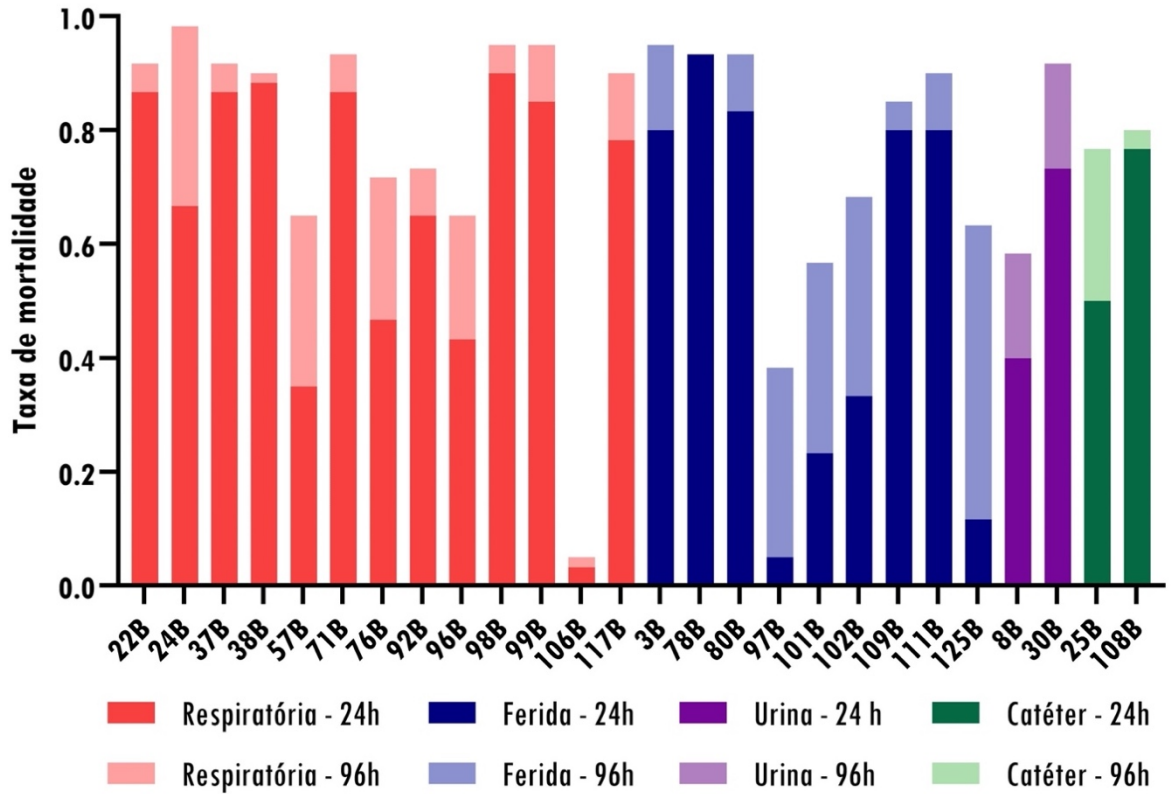
Figura 24 - Taxas de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com inóculo de *A. baumannii* em concentração de 10^5 UFC (n=14, cepas 92B a 125B, e a ATCC 19606)



Fonte: a autora (2024)

As variações nas taxas de mortalidade observadas entre 24 h e 96 h para cada uma das cepas clínicas foram analisadas para discriminar melhor os níveis de virulência (Figura 25).

Figura 25 – Variações nas taxas de mortalidade de *G. mellonella* em 24h e 96h após infecção com 26 cepas clínicas de *A. baumannii*



Fonte: a autora (2024)

7. Discussão

A crescente preocupação com a RAM tem impulsionado a busca por novas estratégias terapêuticas. Nesse cenário, os complexos metálicos derivados da fendiona surgem como uma alternativa promissora, especialmente diante das dificuldades em desenvolver antimicrobianos com mecanismos de ação inovadores. O processo de avaliação de novos agentes antimicrobianos envolve a condução de investigações microbiológicas detalhadas, com o objetivo de fornecer dados preliminares sobre seus efeitos e, posteriormente, auxiliar nas análises de PK/PD (EMA, 2022; LISTER, 2006; PALMER et al., 2022). Esses dados são cruciais para definir o espectro de atividade de um composto antimicrobiano e, por isso, devem ser obtidos a partir de um grupo amostral amplo e diversificado. Nesse contexto, é essencial incluir cepas com subtipos genéticos distintos, com resistência a diferentes antimicrobianos e classes, permitindo avaliar o potencial de resistência cruzada entre os compostos testados e os antimicrobianos já utilizados na prática clínica (EMA, 2022; TACCONELLI et al., 2017).

Nosso grupo amostral consistiu em 26 cepas clínicas de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos, exibindo uma ampla faixa de variação de CIM (16-128 µg/mL). A maioria das cepas apresentou um perfil MDR (84,6%), principalmente para fluoroquinolonas (100%), sulfonamidas (100%) e aminoglicosídeos (80,77%), conforme descrito por Ventura et al., 2020. Apesar das cepas exibirem taxas de resistência pronunciadas e heterogêneas, os valores de CIM de Cu-fendiona e Ag-fendiona (CIM 90 = 1,56 µg/mL para ambos) foram relativamente homogêneos e menores do que os de *P. aeruginosa* (CIM 90 = 12,5 µg/mL para ambos) e *K. pneumoniae* (CIM 90 = 25 µg/mL para Cu-fendiona e 12,5 µg/mL para Ag-fendiona) (PEREGRINO et al., 2021; VENTURA et al., 2020; VIGANOR et al., 2015). Tais resultados foram considerados promissores, nos encorajando a prosseguir com as investigações microbiológicas e farmacológicas nessa espécie crítica e, especialmente, em cepas com opções terapêuticas limitadas, como é o caso das CRAB.

Inicialmente, realizamos a confirmação da identificação da espécie *A. baumannii* em nossas cepas, anteriormente estabelecida por meio de testes bioquímicos recomendados para identificação presuntiva, pelo sistema automatizado “Vitek 2” e pela detecção do gene intrínseco *blaOXA-51* (VENTURA et al., 2020).

Considerando o tempo decorrido desde essas análises e as discussões recentes sobre a acurácia desses métodos, especialmente em razão da alta similaridade filogenética entre as espécies do complexo Abc, optamos por confirmar a identificação utilizando o método MALDI-TOF/MS. Esse método, amplamente reconhecido por sua rapidez e precisão na identificação bacteriana em nível de espécie, é particularmente eficaz para diferenciar espécies do gênero *Acinetobacter*, que apresentam desafios taxonômicos significativos devido à proximidade genética (KRISHNARAJ et al., 2023; LI; TANG; LU, 2018; MARÍ-ALMIRALL et al., 2017; VIJAYAKUMAR; BISWAS; VEERARAGHAVAN, 2019). A análise por MALDI-TOF/MS confirmou a identificação precisa de *A. baumannii* em todas as 26 cepas estudadas, corroborando os resultados dos métodos anteriores. Com essa identificação de alta confiabilidade, reforçamos a validade dos estudos prévios sobre a atividade antimicrobiana de Cu-fendiona e Ag-fendiona contra *A. baumannii*, confirmando a eficácia dos compostos nessa espécie e, sobretudo, em cepas CRAb, consideradas patógenos críticos pela OMS (2024).

Encontramos resistência à colistina em 6,67% (1/15) e resistência intermediária em 13,33% (2/15) das cepas. Para a polimixina B, 10% (2/20) das cepas foram classificadas como resistentes e 40% (8/20) apresentaram resistência intermediária. Ainda, obtivemos resultados inconclusivos em 11 cepas para colistina e seis para polimixina B, com ocorrência frequente de “*skipped wells*” comprometendo a acurácia dos resultados quanto à obtenção de taxas de resistência, visto que as taxas de resistência inferiores obtidas para a colistina, em comparação com a polimixina B, podem estar decorrendo da maior incidência de resultados inconclusivos na primeira. Apesar disso, nossos achados estão alinhados com uma revisão sistemática abrangendo estudos de 41 países, incluindo o Brasil, a qual descreveu taxas de resistência à colistina em *A. baumannii* variando de 0,2% a 17,5% entre diferentes as regiões do mundo (PORMOHAMMAD et al., 2020). Ainda, estudos realizados em regiões específicas do Brasil indicam taxas de resistência bastante variadas. Similarmente aos nossos resultados, Jara et al. (2020) encontraram taxa de resistência à colistina de 8,7%, ao avaliar 46 cepas MDRAb isoladas de pacientes de dois hospitais do Pelotas – RS. Dias et al. (2017) avaliaram 44 cepas CRAb, isoladas em um hospital de Juiz de Fora – MG, encontrando 100% de suscetibilidade à colistina. Contrastando com esses resultados, Nodari et al. (2020), ao analisar 18 cepas de *Acinetobacter spp.*, isoladas de cinco hospitais terciários da região Sudeste (SP e ES), encontraram taxa de resistência de 66% para colistina e polimixina B.

A avaliação dos parâmetros PD é uma etapa crucial no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos, pois permite elucidar a relação entre a concentração do composto, sua eficácia antimicrobiana e o tempo de ação. A avaliação desses parâmetros, e a sua integração com dados de PK, durante as fases iniciais do desenvolvimento proporcionam uma orientação racional para os testes subsequentes e maximizam a eficácia terapêutica dos novos compostos (JORDA; ZEITLINGER, 2020; PALMER et al., 2022). Em nosso estudo, a análise da relação exposição-resposta de Cu-fendiona e Ag-fendiona contra *A. baumannii* revelou aspectos importantes sobre o seu perfil PD e a relação entre a atividade do composto, dose e tempo. Foi demonstrada uma potente atividade antimicrobiana para ambos os compostos, promovendo redução consistente na população bacteriana em concentrações a partir da CIM. Ambos os complexos metálicos demonstraram atividade bactericida consistente em concentrações a partir da CIM, com um pico de atividade observado entre 6 e 12 horas e efeitos sustentados até 24 horas, particularmente nas concentrações mais elevadas. Em concentrações de 1x e 4x CIM, os compostos exibiram perfis de atividade semelhantes, alcançando reduções de aproximadamente 3 log no crescimento bacteriano. No entanto, na maior concentração testada (16x CIM), Ag-fendiona demonstrou um efeito notadamente mais potente, promovendo uma redução superior a 5 log. O perfil de resposta antibacteriana mais pronunciada da Ag-fendiona pode ser atribuído à atividade da prata presente neste composto, visto que esse metal é considerado um dos mais potentes em termos de toxicidade bacteriana, exibindo propriedades antimicrobianas bem documentadas (FREI, 2023). Outra hipótese consiste na maior penetração celular de Ag-fendiona, em comparação com Cu-fendiona. Esses dados corroboram o perfil de atividade encontrado por Galdino (2019), ao avaliar a cinética de ação dos mesmos compostos com 5 isolados clínicos de *P. aeruginosa* e a cepa padrão ATCC 27853. No trabalho citado, também foi demonstrado o efeito bactericida de Cu-fendiona e Ag-fendiona, em concentrações equivalentes a 1x e 2x CIM.

Ainda com base na análise das curvas de exposição-resposta, observamos que o aumento da concentração não amplificou proporcionalmente a eficácia antimicrobiana de Cu-fendiona e Ag-fendiona, revelando um perfil de atividade tempo-dependente para ambos os compostos. Esse comportamento foi particularmente evidente para Cu-fendiona, cujas curvas mantiveram perfis muito semelhantes entre as diferentes concentrações. Para Ag-fendiona, embora a atividade também tenha

sido majoritariamente tempo-dependente, notou-se uma maior influência da concentração, refletida pela maior separação entre as curvas de diferentes concentrações. O perfil de atividade observado para ambos os compostos pode ser explicado pela natureza complexa e multifacetada de seus mecanismos de ação. Os efeitos cumulativos decorrentes da quelação gradual de metais essenciais e da geração progressiva de estresse oxidativo interferem em múltiplos processos celulares, intensificando-se ao longo do tempo e levando a um desequilíbrio homeostático crescente na célula bacteriana. Ainda, a saturação do efeito antibacteriano em concentrações relativamente baixas (1-4x CIM) sugere uma interação específica com alvos celulares, possivelmente limitada por processos de internalização ou pela disponibilidade de sítios de ligação. Um perfil de atividade semelhante é observado em antibióticos beta-lactâmicos, reconhecidos por seus efeitos tempo-dependentes. Esse comportamento ocorre devido ao seu mecanismo de ação, que envolve a interação com as proteínas ligadoras de penicilina, as quais, segundo indicam estudos *in vitro*, tornam-se saturadas em concentrações próximas a 5x CIM da bactéria (CZOSNOWSKI; MIANO, 2014). De modo geral, considerando que antimicrobianos dependentes do tempo permitem maior flexibilidade no planejamento de regimes de dosagem, essa característica parece ser vantajosa para o desenvolvimento dos complexos metálicos à base de fendiona como fármacos antimicrobianos. Ainda, a ausência de indícios de tolerância, persistência ou heterorresistência durante o período de observação (24 h) é encorajadora, sugerindo um baixo potencial para o desenvolvimento rápido de resistência.

Investigamos os efeitos de um hipotético fracionamento de doses, testando um esquema composto por duas doses correspondentes a 0,5x CIM, administradas com intervalo de 6 h. Esse intervalo foi definido com base nos resultados do teste anterior, em que foi verificado que o pico de ação dos compostos é alcançado a partir de 6 h pós-exposição. Os resultados evidenciaram uma robusta eficácia *in vitro* da estratégia de fracionamento de doses para Cu-fendiona e Ag-fendiona contra as cepas bacterianas testadas. Potente atividade bactericida foi observada entre 3 e 6 h após a aplicação da segunda dose dos compostos, com erradicação da maioria das cepas (86%). O fracionamento em duas doses de 0,5x CIM, totalizando 1x CIM, potencializou significativamente os efeitos antibacterianos, em comparação com a administração de uma única dose de 1x CIM, como observado nos testes de exposição-resposta. Esses resultados sugerem que a manutenção de uma concentração efetiva ao longo do

tempo é determinante para a atividade bactericida desses compostos, compatível com o perfil tempo-dependente observado anteriormente. Tais achados têm implicações relevantes no desenvolvimento de estratégias terapêuticas otimizadas, propondo que regimes de dosagem mantendo concentrações reduzidas de forma contínua podem ser mais eficazes do que aqueles que buscam picos de concentração elevados, podendo ainda resultar em menor toxicidade e reduzir o risco de desenvolvimento de resistência. Estudos adicionais são necessários para explorar o potencial desta abordagem, investigando os impactos de diferentes esquemas de fracionamento, a partir de modelos *in vitro* mais complexos e *in vivo*.

A avaliação da duração do EPA é crucial na avaliação de candidatos a fármacos antimicrobianos, pois fornece informações sobre a duração da supressão bacteriana após a exposição ao agente, influenciando diretamente o regime de dosagem ideal e a eficácia terapêutica (SCHUCK; DERENDORF, 2005). Em nosso estudo, avaliamos a duração do EPA produzido a partir da exposição por 1 h a Cu-fendiona e Ag-fendiona, em concentração equivalente 5x CIM. A análise dos dados obtidos indicou a presença do EPA em ambos os compostos, ainda que com duração modesta. Notavelmente, Ag-fendiona apresentou EPAs mais prolongados em comparação à Cu-fendiona, com uma média de 1,14 h superior. A partir da interpretação dos gráficos podem ser observadas diferenças mais substanciais entre as dinâmicas de recuperação de crescimento dos compostos, com Ag-fendiona demonstrando EPAs substancialmente mais duradouros do que Cu-fendiona. Tais achados sugerem uma subestimação dos valores obtidos por meio da fórmula para cálculo do EPA, gerando valores pouco acurados, devido às limitações inerentes à metodologia do teste, que gera dados em intervalos temporais, sem cobertura contínua ao longo do experimento. Srimani et al. (2017) também destacaram tais limitações em seu trabalho, reconhecendo a obtenção de dados esparsos e temporalmente imprecisos na avaliação do EPA quando realizada apenas com base na fórmula proposta. Assim, ao priorizarmos a análise gráfica sobre a numérica, tornam-se evidentes as diferenças entre os EPAs de Ag-fendiona e Cu-fendiona.

A comparação entre as curvas de EPA de Cu-fendiona e Ag-fendiona com as curvas geradas para os antimicrobianos clássicos confirmou as observações descritas acima. As análises gráficas comparativas mostraram que a dinâmica de recuperação do crescimento para Cu-fendiona foi bastante similar à do MEM, reconhecido por induzir um EPA moderado em bactérias gram-negativas (PAI et al., 2015). Em

contraste, as curvas de EPA de Ag-fendiona exibiram um perfil semelhante ao perfil da CIP, para a qual são descritos tempos de recuperação mais prolongados, mesmo em bactérias gram-negativas, sendo significativamente impactados pelo aumento das concentrações aplicadas (PAI et al., 2015). Esses achados estão de acordo com a literatura, que sugere que substâncias com perfil de atividade tempo-dependente exibem valores mínimos de duração de EPA, conforme observado para a Cu-fendiona e para o MEM (JACOBS, 2001). Em contraste, para substâncias com perfil de atividade concentração-dependente, como a CIP, ou com perfil híbrido (dependente de tempo e concentração), como no caso da Ag-fendiona, os EPAs tendem a ser mais prolongados (ABDELRAOUF et al., 2017; REED, 2000). Por fim, os resultados obtidos pela determinação do EPA não apenas contribuem para nossa compreensão das características PD dos complexos metálicos à base fendiona, mas também sublinham sua correlação com antimicrobianos convencionais, oferecendo informações valiosas para orientar as futuras etapas de desenvolvimento.

Considerando que a maioria dos testes para avaliação da atividade antimicrobiana são realizados em condições padronizadas de densidade bacteriana (normalmente $\sim 10^5$ UFC/mL), torna-se fundamental investigar os impactos da variação da concentração inicial de inóculo sobre a CIM (LOFFREDO et al., 2021). Essas informações podem ser posteriormente incorporadas a um modelo PK/PD que, ao considerar o efeito de inóculo, mostra-se mais preditivo em cenários clínicos (RATHI, 2016). Nossos resultados demonstraram que concentrações crescentes de células de *A. baumannii* não afetam diretamente os valores de CIM de Cu-fendiona e Ag-fendiona, visto que incrementos de 100 vezes no inóculo inicial (10^4 UFC/mL), não modificaram a CIM em nenhuma das seis cepas clínicas. Um aumento total de 10.000 vezes na carga bacteriana (de 10^4 para 10^8 UFC/mL) provocou uma elevação de máxima de 4 vezes na CIM, de modo que a concentração de 3,12 $\mu\text{g/mL}$ foi eficaz na erradicação de mais de 98% dos inóculos testados, considerando ambos os compostos. Essa capacidade dos complexos metálicos à base de fendiona em manter atividade antimicrobiana, mesmo com concentrações substancialmente maiores de inóculo, demonstra seu potencial como candidatos promissores para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. De forma semelhante, Jangra e colaboradores (2019) demonstraram um discreto efeito de inóculo do composto “tridecaptina M” frente à cepa de referência *K. pneumoniae* ATCC 700603. Nesse

estudo foi observado um aumento de 2-4 vezes na CIM frente ao aumento da carga bacteriana de 10^5 para 10^9 UFC/mL.

A avaliação do efeito de inóculo em nosso estudo também permitiu conjecturar sobre o possível mecanismo de ação dos complexos metálicos derivados da fendiona. Os resultados obtidos endossam a hipótese de que os compostos penetram a célula bacteriana e/ou a parede celular, processo que depende de difusão. Assim, nem todas as moléculas do composto estariam envolvidas em exercer o efeito antibacteriano, com parte delas sendo também responsáveis por formar um gradiente de difusão. No mencionado estudo de Jangra et al. (2019), o desenvolvimento de testes *in vitro* de PK comprovou que apenas 25-30% da tridecaptina M aplicada foi necessária para eliminar o inóculo inicial, em cultura de alta densidade, e que o restante do composto estava intacto no sobrenadante. Esses achados explicam a ausência de uma relação linear entre número de UFC e concentração do antimicrobiano (JANGRA et al., 2019). Futuras investigações acerca das propriedades PK de Cu-fendiona e Ag-fendiona podem ajudar a confirmar nossas hipóteses sobre seu mecanismo de ação.

A investigação do risco de desenvolvimento de resistência é um componente fundamental no processo de pesquisa e desenvolvimento de antimicrobianos para garantir a manutenção da eficácia a longo prazo (ABDUL-AZIZ et al., 2015; JACKSON et al., 2018; UPRETI et al., 2018). Em nosso estudo, avaliamos a existência de subpopulações resistentes aos complexos metálicos, com foco em fenômenos como tolerância e heteroresistência, utilizando o método "TD test" descrito por Gefen et al. (2017). De acordo com os autores, o fenômeno de tolerância é identificado no "TD test" quando, após a substituição do disco com antimicrobiano pelo disco contendo glicose, observa-se o crescimento de colônias no interior do halo de inibição. Esse crescimento é favorecido pela redução da concentração do antimicrobiano após 24 h de incubação, atingindo valores abaixo da CIM, o que permite que subpopulações tolerantes, em estado de metabolismo reduzido, retomem o crescimento com o fornecimento de nutrientes pelo disco de glicose. Em nossos resultados, halos de inibição similares foram observados para Cu-fendiona e Ag-fendiona, com diâmetros entre 16 e 21 mm, sem redução significativa após a substituição pelo disco de glicose. Quanto ao crescimento de colônias dentro da zona de inibição, não foi identificado um padrão consistente indicativo de tolerância. No entanto, colônias isoladas foram frequentemente observadas, próximas à borda do crescimento confluyente, após as primeiras 24 h de incubação. Um resultado similar foi reportado por Gefen et al. (2017)

em apenas uma de suas replicatas, associando-o a uma subpopulação resistente, como evidenciado pela determinação da CIM da colônia isolada. Os autores sugeriram o fenômeno de heterorresistência como explicação para esse crescimento no halo de inibição nas primeiras 24 h de incubação. Contudo, isso não parece aplicar-se aos nossos resultados com Cu-fendiona e Ag-fendiona, pois as CIMs das colônias isoladas foram idênticas ou muito próximas às da cepa parental. Dada a ausência de estudos sobre a difusão em meio sólido desses complexos à base de fendiona, especula-se que uma possível difusão heterogênea possa estar relacionada ao perfil de resultados observado.

Buscando investigar mais a fundo o potencial de desenvolvimento de resistência aos complexos à base de fendiona, a cepa de referência ATCC 19606 foi testada usando o método de passagem em seriada (dados preliminares). Culturas bacterianas expostas a concentrações crescentes de Cu-fendiona e Ag-fendiona demonstraram capacidade de crescimento em concentrações ligeiramente superiores à CIM. De forma similar ao “TDtest”, a subsequente determinação da CIM nas cepas derivadas forneceu valores idênticos ou muito próximos aos das cepas parentais. Embora a não seleção de subpopulações resistentes seja um resultado promissor, isto não exclui a possibilidade de desenvolvimento de resistência global em outras cepas, sendo necessária uma avaliação mais abrangente. No entanto, limitações técnicas como o elevado risco de contaminação e a necessidade de grandes volumes das soluções dos compostos impossibilitaram a extensão destes ensaios para cepas clínicas adicionais.

Os complexos metálicos derivados da fendiona têm demonstrado um notável potencial antivirulência contra patógenos bacterianos, incluindo *A. baumannii*. Foi demonstrada anteriormente, por Ventura et al. (2020), a atividade antibiofilme de Cu-fendiona e Ag-fendiona em *A. baumannii*, com redução significativa na formação e na viabilidade de biofilmes maduros em baixas concentrações. Esses achados motivaram a expansão da pesquisa para avaliar outros atributos de virulência dessa espécie, possibilitando uma análise mais abrangente dos efeitos dos complexos metálicos sobre essas características. O fenótipo mucoide, também conhecido como hipermucosidade, constitui uma resposta adaptativa de defesa importante em bactérias patogênicas, como *A. baumannii* (SHAN et al., 2021). Esse fenótipo envolve a superprodução de mucopolissacarídeos, resultando na formação de cápsulas espessas que atuam como barreiras físicas, reduzindo a penetração de

antimicrobianos e dificultando a remoção das bactérias pelo sistema imunológico do hospedeiro (KON et al., 2020; SINGH et al., 2019). Investigamos a presença de cepas hipermucoides em nosso grupo amostral por meio de inspeção visual da morfologia colonial, em conjunto com o teste de “string”. As cepas analisadas apresentaram diferentes tipos morfológicos em relação ao tamanho e ao nível de mucosidade das colônias, seguindo o perfil de correlação amplamente descrito na literatura, em que cepas não-mucoides tendem a formar colônias pequenas, enquanto as cepas mucoides formam colônias maiores (KON et al., 2020; RAKOVITSKY et al., 2021; SHAN et al., 2021). Elevada diversidade morfológica foi observada entre as cepas e, apesar de muitas apresentarem mucosidade elevada, apenas uma foi classificada como hipermucoide. De maneira semelhante aos nossos achados, Valcek et al. (2023) relataram elevada diversidade morfológica entre 43 isolados clínicos de *A. baumannii*, identificando três cepas hipermucoides. A influência do nível de mucosidade (e conseqüentemente da espessura da cápsula) no perfil de suscetibilidade de *A. baumannii* também tem sido explorada, com alguns estudos confirmando a associação de altos níveis de resistência, incluindo o perfil MDR, com cepas altamente mucoides (SHAN et al., 2021; TUCHSCHERR et al., 2011). No entanto, em nosso estudo, devido às elevadas taxas de resistência observadas em todas as cepas, com uma predominância massiva de cepas MDR, não foi possível estabelecer essa correlação.

Em relação ao teste de “string”, embora nenhuma das cepas testadas tenha obtido resultado positivo, foram observados cordões viscosos de comprimento variável (<5 mm) entre as cepas, sugerindo a presença de distintos graus de mucosidade. A cepa 30B, caracterizada morfológicamente como hipermucoide, apresentou cordões extensos, com comprimento médio de 4,4 mm, compatível com o esperado para esse fenótipo, ainda que não tenha atingido os critérios do teste para um resultado positivo. Esses achados sugerem uma distinção entre o fenótipo mucoide de *A. baumannii*, associado à produção de cápsula, e o fenótipo hipermucoide típico descrito em cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae*. Nájera, Ramos e Camacho (2017) demonstraram a existência de dois fenótipos de elevada mucosidade em *K. pneumoniae*: o hipermucoide, associado a variantes hipervirulentas e identificado por “string test” positivo; e o fenótipo mucoide relacionado à cápsula, que não resulta necessariamente em um teste positivo. Os resultados desse estudo corroboram nossos achados, que demonstram a ausência

de cordões viscosos compatíveis com "string test" positivo na nossa cepa hipermucoide.

Além disso, nossos resultados não mostraram uma correlação clara entre o nível de mucosidade das colônias e o comprimento dos filamentos. Algumas cepas altamente mucoides formaram filamentos curtos, enquanto cepas com mucosidade moderada apresentaram cordões comparáveis aos da cepa hipermucoide. Esses achados sugerem que, em *A. baumannii*, o teste de "string" pode não ser um indicador confiável para avaliar o fenótipo mucoide ou sua relação com a virulência, como ocorre em *K. pneumoniae*. A formação de filamentos no teste parece ser influenciada por outros fatores além da espessura da cápsula ou do nível de mucosidade visível, indicando que o fenótipo mucoide em *A. baumannii* pode ser um fenômeno multifatorial. Contrariamente aos nossos resultados, Gong et al. (2022) demonstraram uma correlação direta entre o grau de mucosidade e o comprimento do filamento viscoso em três cepas clínicas de *A. baumannii*, além de observar maior abundância de cápsula na cepa hipermucoide. Esses resultados ressaltam a importância de aprofundar as avaliações sobre o fenótipo de mucosidade das cepas estudadas, empregando métodos aprimorados e menos subjetivos, para elucidar a relação entre o fenótipo mucoide, a cápsula e a patogenicidade dessas cepas.

Investigamos a presença de atividade hemolítica utilizando AS, e os resultados indicaram que nenhuma das cepas estudadas apresentou capacidade de induzir hemólise. Antunes et al. (2011) avaliaram a atividade hemolítica de três isolados de *A. baumannii* provenientes da Europa, além de uma cepa-padrão da mesma espécie, utilizando sangue de ovelha e cavalo, em meios líquido e sólido. Todas as cepas testadas exibiram atividade hemolítica, mas esta foi detectada apenas em sangue de cavalo, com maior intensidade no meio líquido em comparação ao sólido. Esses achados nos levam a questionar se a ausência de capacidade hemolítica em nossas cepas pode ser atribuída ao uso exclusivo de sangue de carneiro, testado apenas em meio sólido. Contrariamente, Ali et al. (2017) detectaram atividade hemolítica em 78% das 32 cepas clínicas de *A. baumannii* utilizadas em seu estudo, provenientes da Arábia Saudita, utilizando somente sangue de carneiro em meio sólido. Costa et al. (2020) investigaram a capacidade hemolítica de 29 cepas clínicas de *A. baumannii*, isoladas de pacientes em um hospital de Belo Horizonte (Brasil), utilizando o método em meio sólido com sangue humano, de carneiro e de cavalo. Similarmente aos nossos resultados, esse estudo não detectou atividade hemolítica em nenhuma das

cepas analisadas, independentemente do tipo de sangue utilizado. Assim, se considerarmos que a ausência de hemólise em nossos testes reflete a real incapacidade hemolítica dessas cepas, podemos conjecturar que as diferenças observadas em relação aos resultados de Antunes et al. (2011) e Ali et al. (2017) sejam decorrentes da disseminação regional de subtipos genéticos específicos, com cepas sem atividade hemolítica prevalecendo no Brasil.

Embora *A. baumannii* tenha sido inicialmente considerado um patógeno imóvel, estudos recentes demonstram que isolados dessa espécie podem apresentar motilidade, e que essa está associada ao aumento da virulência e da capacidade de causar infecções (GRIER et al., 2021; SHADAN et al., 2023). *A. baumannii* dispõe de dois mecanismos distintos de movimento: o "*twitching*", dependente de pili, e a motilidade de superfície, independente de apêndices celulares (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2017). Um estudo recente indicou que a motilidade de superfície desempenha um papel mais significativo na virulência de *A. baumannii*, conforme observado em modelo de *G. mellonella* (CORRAL et al., 2021). Em nosso estudo, avaliamos a motilidade de superfície das cepas de *A. baumannii*, utilizando meio semissólido (LB 0,3% de ágar). Os resultados revelaram a ausência de motilidade significativa para a vasta maioria das cepas, exibindo áreas médias de deslocamento menores que 90 mm², com exceção de duas: uma com motilidade discreta (122,0 ± 31,1 mm²) e outra com motilidade pronunciada, ocupando toda a área da placa (~6.352 mm²). A motilidade acentuada dessa última cepa foi caracterizada pela expansão no meio de cultura, a partir do ponto central de inoculação, formando ramificações semelhantes a tentáculos, com morfologia variável. Esse padrão também foi observado por Clemmer, Bonomo e Rather (2011), ao examinar a motilidade de superfície de 12 cepas de *A. baumannii*, sob condições semelhantes às do nosso estudo. No trabalho citado, uma das cepas clínicas apresentou motilidade acentuada e com perfil de ramificações, enquanto outras três cepas clínicas, uma ambiental e uma cepa-padrão exibiram motilidade relevante, porém sem o padrão de ramificações. Resultados similares foram reportados por Grier et al. (2021), que avaliaram a motilidade de superfície de duas cepas clínicas e duas cepas-padrão (ATCC 19606 e ATCC 17978), também em meio semissólido contendo 0,3% de ágar. A cepa ATCC 19606 apresentou uma área média de deslocamento de 65 mm², consistente com a média obtida em nosso estudo (48 mm²), consistindo em uma motilidade não relevante. As cepas clínicas exibiram motilidade discreta, e apenas a cepa ATCC

17978 demonstrou motilidade expressiva, porém sem o padrão de ramificações. Curiosamente, no mesmo estudo, foi avaliada a motilidade "*twitching*", com resultados indicando maior motilidade nas cepas clínicas, enquanto as cepas-padrão não apresentaram esse tipo de movimento, o que não se correlaciona com os resultados da motilidade de superfície. Esses achados reforçam a importância de também avaliar a motilidade "*twitching*" em nossas cepas, para elucidar a relevância dos diferentes tipos de motilidade na sua patogenicidade.

A adesão bacteriana e a formação de biofilme são processos cruciais na patogênese de *A. baumannii*, sendo, portanto, alvos promissores para a terapia antivirulência (POMPILIO et al., 2021; WANG et al., 2019). Os resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, evidenciando a potente ação antibiofilme de Cu-fendiona e Ag-fendiona em *A. baumannii*, motivaram uma investigação mais aprofundada sobre a produção de biofilme nessas cepas e os fatores envolvidos nesse processo complexo. A HSC constitui um fator importante relacionado à adesão microbiana a superfícies hidrofóbicas, como os hidrocarbonetos, e a diversos polímeros (CHOI; BAE; LEE, 2015; MEA, 2021). Além de influenciar a adesão a superfícies abióticas, a HSC também favorece a colonização de tecidos, uma vez que a adesão representa o primeiro estágio desse processo (KRASOWSKA; SIGLER, 2014). Avaliamos HSC por meio do ensaio MATH utilizando n-octano, e os resultados mostraram uma ampla variação entre as cepas clínicas de *A. baumannii* (4,6% a 41%), embora a maioria (73%) tenha apresentado um caráter predominantemente hidrofílico. Esses achados estão de acordo com o estudo de McQueary (2011), que também relatou variações significativas na HSC de oito cepas clínicas de *A. baumannii*. A alta variabilidade observada em nosso estudo, assim como a HSC de aproximadamente 16% da cepa-padrão ATCC 19606, é semelhante aos resultados obtidos por Ramezanalizadeh et al. (2022), que relataram 20% de HSC para a mesma cepa ao utilizar o p-xileno como hidrocarboneto no ensaio MATH. Esses dados destacam a diversidade fenotípica de *A. baumannii* em relação à HSC, sugerindo que essa característica pode influenciar de forma significativa as interações da bactéria com diferentes superfícies.

Ainda, nossos resultados indicaram que cepas com menor mucosidade exibiram níveis significativamente mais altos de HSC, enquanto cepas com mucosidade mais elevada exibiram caráter mais hidrofílico. Essa correlação negativa entre mucosidade e HSC está de acordo com a literatura, que sugere que cápsulas mais espessas, caracterizadas por sua natureza hidrofílica, estão associadas a

superfícies microbianas menos hidrofóbicas (DOYLE, 2000; CRESS et al., 2015; FISHER et al., 1989). Skerniškytė et al. (2019) observaram que cepas de *A. baumannii* com caráter hidrofílico exibiam maior resistência à dessecação, além paredes celulares mais espessas, sugerindo uma produção mais acentuada de cápsula nessas cepas, em comparação com as cepas hidrofóbicas. Esses achados corroboram nossa hipótese de que cepas com cápsulas mais espessas e, portanto, mais mucoides, apresentam HSC inferior. Assim, nossos resultados reforçam o conceito de que a espessura da cápsula pode influenciar diretamente as propriedades hidrofóbicas da célula microbiana, afetando potencialmente sua capacidade de adesão e formação de biofilme.

O pZ fornece uma estimativa da carga elétrica presente na superfície celular bacteriana, sendo um parâmetro relevante para entender as interações celulares e a adesão bacteriana (MAILLARD et al., 2021; WYNESS et al., 2018). Em nosso estudo, avaliamos o pZ das cepas de *A. baumannii* utilizando suspensões bacterianas em água para injeção. Os resultados revelaram que todas as cepas analisadas exibiram carga superficial eletronegativa, com variação significativa entre elas (-46 a -21,6 mV). Essa diferença nos valores de pZ reflete a heterogeneidade nas propriedades da superfície celular, que pode estar relacionada à composição dos polissacarídeos capsulares e à expressão de outras moléculas de superfície, como o LPS. Soon et al., (2011) avaliaram o pZ de seis cepas clínicas de *A. baumannii*, além da cepa-padrão ATCC 10606, utilizando suspensões em água ultrapura, a partir de células bacterianas em fases de crescimento estacionária e logarítmica. Os resultados obtidos estão em consonância com os nossos, com todas as cepas exibindo carga eletronegativa, exibindo ampla variação (-60.5 a -26.2 mV). O valor de pZ da cepa ATCC 19606, em condições similares às do nosso estudo (fase estacionária), foi de ~35 mV, valor muito próximo ao observado em nossos resultados (-34 mV). Correlação positiva significativa foi demonstrada entre os valores de HSC e pZ, porém de intensidade fraca. Estudos correlacionando essas duas propriedades superficiais em células bacterianas ainda são escassos, visto que a investigação do pZ nessas células começou a ser mais amplamente explorada apenas recentemente (HALDER et al., 2015; ONG et al., 2019; SOON et al., 2011). Ainda assim, a correlação encontrada está alinhada com os estudos discutidos anteriormente, que demonstraram que cápsulas bacterianas mais espessas estão associadas a valores de HSC inferiores (CRESS et al., 2015; SKERNIŠKYTĖ et al., 2019). Este fenômeno pode ser explicado

pela natureza das cápsulas bacterianas, constituídas majoritariamente por polissacarídeos hidrofílicos e eletronegativos, que podem conferir às cepas mais encapsuladas, além de uma HSC reduzida, também cargas superficiais mais eletronegativas. Entretanto, a fraca intensidade da correlação observada sugere que outros fatores além da cápsula podem modular a hidrofobicidade e a carga da superfície de células bacterianas, incluindo a composição e organização de proteínas e lipídeos na membrana externa, a expressão de estruturas como pili e fímbrias, bem como variações na composição dos polissacarídeos capsulares.

A PLL é um biopolímero catiônico amplamente utilizado em métodos de cultivo celular devido à sua capacidade de promover a adesão de células eucarióticas a superfícies (YU et al., 2022). No entanto, sua atuação não se restringe apenas a essas células. Estudos mostram que a PLL também promove a adesão de células microbianas, incluindo bactérias e fungos, a superfícies revestidas com esse polímero (ALKEKHIA, 2019; COLVILLE et al., 2009; WANG et al., 2019). A carga positiva da PLL interage eletrostaticamente com as cargas negativas presentes na superfície da célula microbiana, criando um ambiente propício para a adesão (ZHENG et al., 2021). Cowan, Liepmann e Keasling (2001) demonstraram que a PLL pode aumentar a adesão e, conseqüentemente, a formação de biofilme em superfícies de PS, evidenciando o seu potencial para estudar as interações entre células microbianas e superfícies.

Em nosso trabalho, determinamos os níveis de biofilme em substrato convencional de PS (não-coberto) e PS-PLL, para investigar os efeitos desse polímero na adesão e na formação de biofilme das nossas cepas. Foi observada a formação de biofilmes significativamente mais aderentes em substrato de PS não-coberto em comparação ao PS-PLL, cujos níveis de biofilme se aproximaram do controle negativo. Esses resultados indicam que a PLL, apesar de ser amplamente reconhecida por favorecer a adesão celular em superfícies, não teve o efeito esperado na formação de biofilme de *A. baumannii*. Ramalingam e Lee (2019) investigaram a capacidade de formação de biofilmes em lâminas de vidro revestidas com diferentes tipos de polilisina, incluindo PLL, em quatro cepas-padrão de *A. baumannii*. Os resultados indicaram que biofilmes mais densos foram formados em substratos recobertos com polímeros de lisina. Por outro lado, Diepoltová et al. (2021) demonstraram a ausência de efeitos significativos na formação de biofilmes de *Staphylococcus spp.* em substratos modificados com PLL, sugerindo que o impacto desse polímero na adesão

microbiana não é universal. Ainda, os efeitos antimicrobianos da PLL são amplamente descritos, e essa substância tem sido recentemente explorada como material para o desenvolvimento de superfícies antimicrobianas (LEBAUDY et al., 2023; ZHENG et al., 2021; LIU et al., 2023). Saha et al. (2024) demonstraram a capacidade antimicrobiana e antibiofilme da solução de PLL sobre cepas clínicas de MDRAb. Ainda, a literatura sugere que a eficácia do polímero de lisina em promover adesão celular pode depender da espessura do revestimento. Embora coberturas mais espessas possam favorecer a ancoragem de células bacteriana menores, a aplicação de coberturas muito espessas pode produzir efeitos adversos na fisiologia bacteriana e, até mesmo, desencadear atividade antimicrobiana (COLVILLE et al., 2009). Por fim, a compreensão da influência da HSC e da carga de superfície na formação de biofilmes por *A. baumannii* pode auxiliar o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção mais eficazes para mitigar sua disseminação. Porém, nossos resultados não indicaram correlações diretas entre o fenótipo do biofilme (em substrato comum de PS não-coberto) e essas duas propriedades celulares, que poderiam afetar a sua formação em superfícies abióticas.

Microrganismos em suspensão podem se autoagregar, formando agrupamentos densos, os quais são mais propensos a aderirem às superfícies do que as células isoladas (KRAGH; TOLKER-NIELSEN; LICHTENBERG, 2023). Em nosso estudo, as taxas de autoagregação das cepas testadas revelaram uma significativa heterogeneidade. Aproximadamente 73% das cepas exibiram baixa capacidade autoagregativa (médias inferiores a 20%), indicando uma tendência reduzida de formar agregados celulares densos em suspensão. No entanto, um grupo notável de sete cepas, correspondente a 26,9% do total, mostrou uma capacidade de autoagregação acima de 20%. Esses resultados apontam para uma variabilidade importante no comportamento de agregação entre as cepas, que pode estar relacionada a diferenças nos fatores de superfície que promovem a adesão celular. Um exemplo de fator que pode influenciar esse comportamento é a presença da autoaglutinina "AtaA" em *A. baumannii* (ISHIKAWA et al., 2012). No entanto, com base em nossos resultados, parece que sua distribuição não é homogênea entre as cepas da espécie, o que pode explicar as discrepâncias observadas. A correlação significativa, ainda que de baixa intensidade, entre a autoagregação e a formação de biofilme sugere que, embora esses fenômenos possam estar parcialmente interligados, outros fatores podem influenciar a capacidade de formação de biofilme.

Esses achados são consistentes com a literatura, que frequentemente associa a autoagregação à formação de biofilme, mas reconhece que diferentes mecanismos, como a presença de polissacarídeos extracelulares ou proteínas de adesão específicas, podem modular ambos os processos (CHOI; BAE; LEE, 2015; NWOKO; OKEKE, 2021).

Recentemente, modelos invertebrados, como *G. mellonella*, têm sido utilizados para caracterizar atributos de virulência de diferentes patógenos, como *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e diversos fungos causadores de doença (PEREIRA et al., 2020). Peleg e colaboradores (2009) demonstraram que a mortalidade das larvas pela infecção de *A. baumannii* é diretamente dependente do inóculo aplicado, e que a concentração de inóculo de 10^4 UFC exibe sobrevivência elevada, não sendo, portanto, adequada para testes comparativos para determinação de virulência. Antunes et al., (2011) avaliaram os índices de virulência de quatro cepas de *A. baumannii*, por meio do cálculo da dose (de inóculo) letal para 50% das larvas utilizadas no estudo (LD50). Os resultados obtidos indicaram valores de LD50 de $\sim 10^5$ UFC para três das quatro cepas testadas. Baseados nesses resultados, determinamos a aplicação de um inóculo equivalente a 10^5 UFC em nossos experimentos com *G. mellonella*, para a determinação dos índices de mortalidade larvar em até 96 h pós-infecção. As análises das curvas de sobrevivência mostraram variações nas taxas de mortalidade entre as cepas testadas, fornecendo dados discriminativos sobre seus níveis de virulência, e permitindo comparações futuras com os atributos de virulência presentes. Khalil et al. (2021) utilizaram a mesma concentração de inóculo (10^5 UFC) para avaliar a virulência de 54 isolados de *A. baumannii*, comparando as curvas de sobrevivência dessas cepas de acordo com o nível de produção de biofilme. Assim como em nosso estudo, foram observadas variações significativas nos níveis de virulência das cepas testadas.

As análises estatísticas dos resultados não indicaram a presença de correlação significativa entre os atributos de virulência avaliados em *A. baumannii* e as taxas de mortalidade observadas no modelo invertebrado de *G. mellonella*. Esta ausência de correlação foi observada para os índices de mortalidade tanto em 24 h quanto em 96 h pós-infecção, em relação a: nível de mucosidade e formação de “string”, motilidade, HSC, produção de biofilme e autoagregação. Esses achados sugerem que a virulência global de *A. baumannii*, conforme avaliada neste modelo experimental, pode ser resultado de uma interação complexa entre múltiplos fatores, não podendo ser

atribuída a um único atributo ou a um conjunto limitado de características. A falta de correlação direta entre atributos de virulência específicos e a patogenicidade de *A. baumannii* não é incomum na literatura. Por exemplo, Wand et al. (2012) não encontraram correlação significativa entre a formação de biofilme e a virulência em modelo de *G. mellonella*, corroborando nossos achados. De maneira similar, Peleg et al. (2009) observaram que isolados clínicos de *A. baumannii* exibiam variabilidade considerável em sua virulência em modelos animais, sem uma clara correlação com fatores de virulência específicos.

A ausência de correlação observada pode ser explicada pela elevada heterogeneidade fenotípica e genotípica de *A. baumannii*, amplamente relatada na literatura (MAURE; ROBINO; HENST, 2023; SARSHAR et al., 2021; YAO; CHEN; ZHOU, 2023). Kröger et al. (2016) destacam a existência de variabilidade significativa entre cepas em *A. baumannii*, o que dificulta a capacidade de estabelecer correlações consistentes entre os resultados clínicos e as características genéticas ou fenotípicas subjacentes às cepas. Esta heterogeneidade é considerada uma característica distintiva de *A. baumannii*, resultante de um genoma altamente dinâmico e plástico (VALCEK et al., 2023). Maure, Robino e Henst (2023) enfatizam que as estratégias utilizadas por *A. baumannii* para infectar as células hospedeiras não são compartilhadas por todas as cepas, com algumas possuindo fatores de virulência específicos. A complexidade da regulação dos fatores de virulência em *A. baumannii* é outro aspecto crucial para entender a falta de correlações diretas. Gebhardt e Shuman (2017) propõem que essa espécie dispõe de uma via de resposta global ao estresse que permite a manutenção da homeostase celular em múltiplas condições, permitindo uma regulação coordenada da expressão gênica em resposta às condições ambientais encontradas durante o processo infeccioso. Estudos recentes demonstraram que fatores relacionados ao hospedeiro podem induzir respostas patoadaptativas específicas na cepa, indicando uma adaptação dinâmica ao ambiente do hospedeiro (JACOBS et al., 2012; YAO; CHEN; ZHOU, 2023).

A intensa modulação do potencial patogênico de *A. baumannii* torna seu estudo particularmente desafiador, sobretudo em condições *in vitro*, que diferem significativamente do ambiente *in vivo* do hospedeiro, o qual parece exercer um papel fundamental na regulação da expressão gênica dessa espécie. Conseqüentemente, estudos em modelos *in vivo* poderiam fornecer *insights* mais precisos sobre o potencial patogênico de *A. baumannii*, bem como ajudar a elucidar o impacto de

mecanismos de virulência específicos. Nesse contexto, é relevante destacar que a eficácia dos complexos metálicos derivados da fendiona contra cepas de *A. baumannii* em modelo invertebrado de *G. mellonella* foi demonstrada previamente em estudos do nosso grupo (VENTURA, 2019). Esses resultados confirmam o potencial terapêutico desses compostos em condições *in vivo*, em um ambiente que melhor simula as complexidades das interações patógeno-hospedeiro.

Dada a ausência de correlações diretas entre os atributos de virulência específicos e a virulência global determinada no modelo *in vivo*, optamos por não seguir com as avaliações dos efeitos de Cu-fendiona e Ag-fendiona sobre esses atributos em *A. baumannii*. Essa decisão reflete a complexidade e a dinamicidade dos mecanismos de virulência identificados em nosso grupo amostral, sugerindo a presença de processos intrincados e interdependentes. Nesse contexto, abordagens proteômicas e metabolômicas despontam como estratégias mais promissoras para a avaliação da atividade antivirulência dos compostos em *A. baumannii*, com potencial para identificar interferências em vias regulatórias bem estabelecidas nessa espécie. Por fim, a heterogeneidade nos determinantes de virulência observada em nosso grupo amostral, embora tenha imposto desafios para a avaliação da atividade antivirulência dos compostos sobre atributos específicos de *A. baumannii*, forneceu informações valiosas sobre seu espectro de ação e potencial terapêutico. Demonstramos uma atividade antimicrobiana robusta desses compostos, com perfis PD favoráveis, contra um conjunto diversificado de cepas de *A. baumannii*, variando em perfis de resistência e mecanismos de virulência. Esses resultados promissores obtidos com os complexos metálicos derivados da fendiona abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes contra infecções por *A. baumannii*, mesmo diante da complexidade e variabilidade dos mecanismos de virulência desta espécie.

8. Conclusões

- Os complexos metálicos Cu-fendiona e Ag-fendiona demonstraram potente ação bactericida em concentrações a partir da CIM, com pico de atividade entre 6-12 h;
- Ambos os compostos exibiram perfil de atividade predominantemente tempo-dependente, embora a eficácia de Ag-fendiona seja mais influenciada pela dose;
- O fracionamento de doses se mostrou uma estratégia terapêutica promissora, com duas aplicações de 0,5x CIM exibindo eficácia superior a uma única dose equivalente a 1x CIM;
- Foi demonstrada a presença de EPA após a exposição a ambos os compostos, com duração especialmente mais prolongada para Ag-fendiona;
- A atividade antimicrobiana foi mantida mesmo em altas concentrações de inóculo, com aumentos modestos na CIM, mesmo após incrementos significativos na carga bacteriana;
- A ausência de evidências da presença de subpopulações resistentes é favorável ao desenvolvimento destes compostos como agentes antibacterianos;
- Coletivamente, os resultados obtidos sobre o perfil PD de Cu-fendiona e Ag-fendiona sugerem um mecanismo de ação relacionado à difusão e penetração celular, com efeitos progressivos ao longo do tempo;
- Foi demonstrada uma notável heterogeneidade entre os atributos de virulência das cepas estudadas, evidenciada pela variabilidade nos níveis de mucosidade, propriedades de superfície celular, motilidade, capacidade de formação de biofilme e autoagregação;
- A análise das propriedades de superfície celular demonstrou que a maioria das cepas apresentou caráter predominantemente hidrofílico, com uma correlação negativa significativa entre o nível de mucosidade e a HSC;
- Todas as cepas exibiram carga superficial eletronegativa, com variação considerável nos valores de pZ;
- As propriedades da superfície celular não apresentaram correlação direta com a capacidade de formação de biofilme em superfícies de PS;
- A PLL impactou negativamente a formação de biofilme de *A. baumannii* em superfície de PS revestida com o biopolímero;

- A avaliação da virulência no modelo de *G. mellonella* indicou variações nas taxas de mortalidade, sem correlação direta entre atributos específicos de virulência e a patogenicidade global;
- Os resultados sobre a heterogeneidade dos atributos de virulência e a complexidade dos mecanismos patogênicos de *A. baumannii* confirmam a amplitude do espectro de ação de Cu-fendiona e Ag-fendiona;
- De forma geral, os resultados estabelecem uma base sólida para o desenvolvimento dos complexos Cu-fendiona e Ag-fendiona como potenciais alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções por CRAb.

9. Referências Bibliográficas

AHMED, Muhib *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of a phenanthroline-isoniazid hybrid ligand and its Ag⁺ and Mn²⁺ complexes. **Biometals**, v. 32, n. 4, p. 671-682, 22 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-019-00204-5>.

AHMED, Muhib *et al.* Synthesis and characterisation of phenanthroline-oxazine ligands and their Ag(I), Mn(II) and Cu(II) complexes and their evaluation as antibacterial agents. **Biometals**, v. 35, n. 1, p. 173-185, 17 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-021-00358-1>.

ALFARO-FUENTES, Israel *et al.* Novel antihelmintic activity of tinidazole coordination compounds. Relevance of the metal ion and structural properties. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, v. 176, p. 159-167, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.013>.

ALI, Hayssam M *et al.* Investigation of the Virulence Factors and Molecular Characterization of the Clonal Relations of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. **Journal Of Aoac International**, v. 100, n. 1, p. 152-158, 1 jan. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.16-0139>.

ÁLVAREZ-FRAGA, Laura *et al.* Analysis of the role of the LH92_11085 gene of a biofilm hyper-producing *Acinetobacter baumannii* strain on biofilm formation and attachment to eukaryotic cells. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 443-455, 8 fev. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1145335>.

ANTUNES, Luísa C. S. *et al.* Deciphering the Multifactorial Nature of *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 1-10, 1 ago. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022674>.

ANTUNES, L. C.S.; VISCA, P.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathogens And Disease**, v. 71, n. 3, p. 292-301, 27 jan. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/2049-632x.12125>.

APPANEAL, Haley J. *et al.* Treatment, Clinical Outcomes, and Predictors of Mortality among a National Cohort of Admitted Patients with *Acinetobacter baumannii* Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 1-10, 15 mar. 2022. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01975-21>.

ARTHI, Padmanathan *et al.* Multi-target activity of copper complexes: antibacterial, dna binding, and molecular docking with sars-cov-2 receptor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 373, n. 110349, p. 1-13, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110349>.

BARAN, Aleksandra; KWIATKOWSKA, Aleksandra; POTOCKI, Leszek. Antibiotics and Bacterial Resistance - A Short Story of an Endless Arms Race. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5777, 17 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24065777>.

BENCINI, Andrea; LIPPOLIS, Vito. 1,10-Phenanthroline: a versatile building block for the construction of ligands for various purposes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, n. 17-18, p. 2096-2180, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.04.008>.

BISSANTZ, Caterina *et al.* Translational PK/PD for the Development of Novel Antibiotics—A Drug Developer's Perspective. **Antibiotics**, v. 13, n. 1, p. 72-96, 11 jan. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics13010072>.

BREMNER, John B. An Update Review of Approaches to Multiple Action-Based Antibacterials. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 865-883, 6 maio 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics12050865>.

BUTLER, Mark S. *et al.* Analysis of the Clinical Pipeline of Treatments for Drug-Resistant Bacterial Infections: despite progress, more action is needed. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 1-20, 15 mar. 2022. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01991-21>.

CALVERT, Matthew B; JUMDE, Varsha R; TITZ, Alexander. Pathoblockers or antivirulence drugs as a new option for the treatment of bacterial infections. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 14, p. 2607-2617, 11 out. 2018. Beilstein Institut. <http://dx.doi.org/10.3762/bjoc.14.239>.

CAVALLO, Ilaria *et al.* Acinetobacter baumannii in the critically ill: complex infections get complicated. **Frontiers In Microbiology**, v. 14, n. 1196774, p. 1-17, 22 jun. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2023.1196774>.

CEPAS, Virginio *et al.* Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 1, p. 72-79, jan. 2019. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>.

CLATWORTHY, Anne e; PIERSON, Emily; HUNG, Deborah T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 9, p. 541-548, 20 ago. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2007.24>.

CLAUDEL, Mickaël; SCHWARTE, Justine V.; FROMM, Katharina M. New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes. **Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 849-899, 16 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/chemistry2040056>.

CLEMMER, Katy M.; BONOMO, Robert A.; RATHER, Philip N. Genetic analysis of surface motility in Acinetobacter baumannii. **Microbiology**, v. 157, n. 9, p. 2534-2544, 1 set. 2011. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.049791-0>.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; approved standard – Tenth Edition*. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2015.

CLSI (2024)

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 5, p. 1065-1073, 12 abr. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>.

COLVILLE, Keegan *et al.* Effects of Poly(l-lysine) Substrates on Attached Escherichia coli Bacteria. **Langmuir**, v. 26, n. 4, p. 2639-2644, 18 set. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/la902826n>.

CORRAL, Jordi *et al.* Importance of twitching and surface-associated motility in the virulence of *Acinetobacter baumannii*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2201-2213, 13 set. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2021.1950268>.

COSTA, Priscila Simão *et al.* Investigation of Relevant Genes and Pathogenicity Factors in Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Strains Isolated from Clinical Specimens. **Research Trends of Microbiology**, 2020.

COWAN, Stacie E.; LIEPMANN, Dorian; KEASLING, Jay D. Development of engineered biofilms on poly-L-lysine patterned surfaces. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 15, p. 1235-1241, 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1010581503842>.

DAHDOUH, Elias *et al.* Clonality, virulence determinants, and profiles of resistance of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from a Spanish hospital. **Plos One**, v. 12, n. 4, p. 1-18, 27 abr. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176824>.

D'ATANASIO, Noemi *et al.* Antibacterial activity of novel dual bacterial DNA type II topoisomerase inhibitors. **Plos One**, v. 15, n. 2, p. 1-21, 19 fev. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0228509>.

DAVIES, Y. M. *et al.* Virulence and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from passerine and psittacine birds. **Avian Pathology** v. 45, n. 2, p. 194-201, 3 mar. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2016.1142066>.

DEXTER, Carina; MURRAY, Gerald L; PAULSEN, Ian T; PELEG, Anton y. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 13, n. 5, p. 567-573, 8 abr. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/14787210.2015.1025055>

DIAS, Vanessa Cordeiro *et al.* Epidemiological, Physiological, and Molecular Characteristics of a Brazilian Collection of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 7, p. 852-863, out. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2016.0219>.

DICKEY, Seth W.; CHEUNG, Gordon Y. C.; OTTO, Michael. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 7, p. 457-471, 24 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2017.23>.

DIEPOLTOVÁ, Adéla *et al.* Study of the impact of cultivation conditions and peg surface modification on the in vitro biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in a system analogous to the Calgary biofilm device. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 1-10, 28 maio 2021. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.001371>.

DOLMA, Karma G. *et al.* Virulence Characteristics and Emerging Therapies for Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii*: a review. **Biology**, v. 11, n. 9, p. 1343, 12 set. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biology11091343>.

EVANS, Andris; KAVANAGH, Kevin A. Evaluation of metal-based antimicrobial compounds for the treatment of bacterial pathogens. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 1-18, 26 maio 2021. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.001363>.

EZE, Emmanuel; CHENIA, Hafizah; ZOWALATY, Mohamed El. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **Infection And Drug Resistance**, v. 11, p. 2277-2299, nov. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/idr.s169894>.

FALCONE, Marco; PATERSON, David. Spotlight on ceftazidime/avibactam: a new option for mdr gram-negative infections. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 10, p. 2713-2722, 17 jul. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkw239>.

FANG, Chi-Tai *et al.* A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 5, p. 697-705, 1 mar. 2004. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20030857>.

FISHER, D. Allen, P., Saunders, J.R., Hart, C.A. Surface Properties of Klebsiella and E Coli: Role of Capsular Polysaccharide in Protection Against Phagocytosis. In: FISHER, D., Sutherland, I.A. (eds). **Separations Using Aqueous Phase Systems**. Boston: Springer, 1989. p. 169-170. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5667-7_29.

FLORES, Omar E. A.; TORRES, Eduardo; BRAVO, Edith C. Acinetobacter baumannii, a Multidrug-Resistant Opportunistic Pathogen in New Habitats: a systematic review. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 644-660, 23 mar. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms12040644>.

FREI, Angelo. Metal Complexes, an Untapped Source of Antibiotic Potential? **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 90, 18 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics9020090>.

GALES, Ana C *et al.* Antimicrobial Susceptibility of Acinetobacter calcoaceticus–Acinetobacter baumannii Complex and Stenotrophomonas maltophilia Clinical Isolates: results from the sentry antimicrobial surveillance program (1997-2016). **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, p. 34-46, mar. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ofid/ofy293>.

GALDINO, Anna Clara M. *et al.* Copper(II) and silver(I)-1,10-phenanthroline-5,6-dione complexes interact with double-stranded DNA: further evidence of their apparent multi-modal activity towards pseudomonas aeruginosa. **Jbic Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 201-213, 10 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-021-01922-3>.

GANDRA, Rafael M. *et al.* In vivo Activity of Copper(II), Manganese(II), and Silver(I) 1,10-Phenanthroline Chelates Against Candida haemulonii Using the Galleria mellonella Model. **Frontiers In Microbiology**, v. 11, p. 1-15, 24 mar. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00470>.

GASCÓN, A. R.; SOLINÍS, M. Á.; ISLA, A. The Role of PK/PD Analysis in the Development and Evaluation of Antimicrobials. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 833, 3 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13060833>.

GEBHARDT, Michael J.; SHUMAN, Howard A. GigA and GigB are Master Regulators of Antibiotic Resistance, Stress Responses, and Virulence in Acinetobacter

baumannii. **Journal Of Bacteriology**, v. 199, n. 10, p. 0066-0077, 15 maio 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00066-17>.

GEDEFIE, Alemu *et al.* Acinetobacter baumannii Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis: a review. **Infection And Drug Resistance**, v. 14, p. 3711-3719, set. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/idr.s332051>.

GEFEN, Orit *et al.* TDtest: easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 1 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep41284>.

GLOEDE, J. *et al.* In vitro pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 2, p. 186-201, 21 dez. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp434>.

GRANATO, Marcela Queiroz *et al.* 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione-Based Compounds Are Effective in Disturbing Crucial Physiological Events of *Phialophora verrucosa*. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p. 1-9, 30 jan. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00076>.

GRIER, Jennifer T. *et al.* Two *Acinetobacter baumannii* Isolates Obtained from a Fatal Necrotizing Fasciitis Infection Display Distinct Genomic and Phenotypic Characteristics in Comparison to Type Strains. **Frontiers In Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1-18, abr. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2021.635673>.

GUPTA, Renu; SHARMA, Sangeeta. Role of alternatives to antibiotics in mitigating the antimicrobial resistance crisis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 156, n. 3, p. 464, 2022. Scientific Scholar. http://dx.doi.org/10.4103/ijmr.ijmr_3514_20.

GUNDERSON, Brent W. *et al.* What Do We Really Know About Antibiotic Pharmacodynamics? **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 21, n. 11, p. 302-316, nov. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1592/phco.21.11.302s.33905>.

HALDER, Suman *et al.* Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. **Springerplus**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 4 nov. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40064-015-1476-7>.

HANSSON, Kristofer; BRENTHEL, Adam. Imagining a post-antibiotic era: a cultural analysis of crisis and antibiotic resistance. **Medical Humanities**, v. 48, n. 3, p. 381-388, 3 ago. 2022. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/medhum-2022-012409>.

HARDING, Christian M.; HENNON, Seth W.; FELDMAN, Mario F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91-102, 18 dez. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>.

HETTA, Helal F. *et al.* Antibiofilm and antivirulence potential of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 10751, p. 1-11, 24 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-90208-4>.

ISHIKAWA, Masahito *et al.* Evaluation of adhesiveness of *Acinetobacter* sp. Tol 5 to abiotic surfaces. **Journal Of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 6, p. 719-725, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.01.011>.

JACOBS, M.R. Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, n. 11, p. 589-596, nov. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1198-743x.2001.00295.x>.

JACOBS, Anna C. *et al.* Characterization of the *Acinetobacter baumannii* growth phase-dependent and serum responsive transcriptomes. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 403-412, abr. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695x.2011.00926.x>.

JANGRA, Manoj *et al.* Purification and biological activity of natural variants synthesized by tridecaptin M gene cluster and in vitro drug-kinetics of this antibiotic class. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 11 dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-54716-8>.

JARA, Marisa Castro *et al.* Multidrug-Resistant Hospital Bacteria: epidemiological factors and susceptibility profile. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 3, p. 433-440, 1 mar. 2021. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2019.0209>.

JIANG, Yu; GENG, Mengxin; BAI, Liping. Targeting Biofilms Therapy: current research strategies and development hurdles. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 2-34, 11 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8081222>.

JORDA, Anselm; ZEITLINGER, Markus. Preclinical Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Studies and Clinical Trials in the Drug Development Process of EMA-Approved Antibacterial Agents: a review. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 59, n. 9, p. 1071-1084, 30 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40262-020-00892-0>.

KARAMPATAKIS, Theodoros; TSENGOULI, Katerina; BEHZADI, Payam. Pan-Genome Plasticity and Virulence Factors: a natural treasure trove for *Acinetobacter baumannii*. **Antibiotics**, v. 13, n. 3, p. 257, 14 mar. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics13030257>.

KELLETT, Andrew *et al.* Water-soluble bis(1,10-phenanthroline) octanedioate Cu²⁺ and Mn²⁺ complexes with unprecedented nano and picomolar in vitro cytotoxicity: promising leads for chemotherapeutic drug development. **Medchemcomm**, v. 2, n. 7, p. 579-584, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c0md00266f>.

KOS, B. *et al.* Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 981-987, 13 maio 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>.

KRAGH, Kasper N.; TOLKER-NIELSEN, Tim; LICHTENBERG, Mads. The non-attached biofilm aggregate. **Communications Biology**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 1 set. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-023-05281-4>.

KRISHNARAJ, Anusha *et al.* Role of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry for Species Identification of *Acinetobacter*

Strains. **Journal Of Laboratory Physicians**, v. 15, n. 03, p. 336-343, 18 jan. 2023. Scientific Scholar. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-1760401>.

KRÖGER, Carsten; KARY, Stefani; SCHAUER, Kristina; CAMERON, Andrew. Genetic Regulation of Virulence and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Genes**, v. 8, n. 1, p. 12, 28 dez. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes8010012>.

KÓTAI, László. Metal Complexes with N-donor Ligands. **Inorganics**, v. 12, n. 5, p. 130-135, 29 abr. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/inorganics12050130>.

LAU, Wing Y. V. *et al.* Pathogen-associated gene discovery workflows for novel antivirulence therapeutic development. **Ebiomedicine**, v. 88, n. 104429, p. 1-10, fev. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104429>.

LAW, S. K. K.; TAN, H. S. The role of quorum sensing, biofilm formation, and iron acquisition as key virulence mechanisms in *Acinetobacter baumannii* and the corresponding anti-virulence strategies. **Microbiological Research**, v. 260, n. 127032, p. 1-17, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2022.127032>.

LAXMINARAYAN, Ramanan *et al.* Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 168-175, jan. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)00474-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(15)00474-2).

LEBAUDY, Eloïse *et al.* The High Potential of ϵ -Poly-L-Lysine for the Development of Antimicrobial Biomaterials. **Advanced Nanobiomed Research**, v. 3, n. 12, p. 1-18, 27 nov. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anbr.202300080>.

LI, Xiuyuan; TANG, Yanyan; LU, Xinxin. Insight into Identification of *Acinetobacter* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in the Clinical Laboratory. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 29, n. 7, p. 1546-1553, 9 abr. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1007/s13361-018-1911-4>.

LI, Qi *et al.* Carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CR-GNB) in ICUs: resistance genes, therapeutics, and prevention: a comprehensive review. **Frontiers In**

Public Health, v. 12, p. 1-13, 27 mar. 2024. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2024.1376513>.

LI, R. C.; ZHU, Z. Y. The Integration of Four Major Determinants of Antibiotic Action: bactericidal activity, postantibiotic effect, susceptibility, and pharmacokinetics. **Journal Of Chemotherapy**, v. 14, n. 6, p. 579-583, jan. 2002. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1179/joc.2002.14.6.579>.

LISTER, P. D. The role of pharmacodynamic research in the assessment and development of new antibacterial drugs. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 1057-1065, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.038>.

LIU, Jun *et al.* Immobilization of poly-L-lysine brush via surface initiated polymerization for the development of long-term antibacterial coating for silicone catheter. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 221, p. 113015, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.113015>.

LIU, Xuesong *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of enrofloxacin treatment of Escherichia coli in a murine thigh infection modeling. **Bmc Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 9 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-021-02908-8>.

LOFFREDO, Maria Rosa *et al.* Inoculum effect of antimicrobial peptides. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 118, n. 21, p. 1-10, 21 maio 2021. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2014364118>.

LUCIDI, Massimiliano *et al.* Pathogenicity and virulence of Acinetobacter baumannii: factors contributing to the fitness in healthcare settings and the infected host. **Virulence**, v. 15, n. 1, p. 1-28, 6 dez. 2023. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2023.2289769>.

MANCUSO, Giuseppe *et al.* The Challenge of Overcoming Antibiotic Resistance in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria: "attack on titan". **Microorganisms**, v. 11, n. 8, p. 1-16, 27 jul. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11081912>.

MANUKUMAR, H. M.; UMESHA, S. MALDI-TOF-MS based identification and molecular characterization of food associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 12 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11597-z>.

MARTÍNEZ, Osmel Fleitas *et al.* Recent Advances in Anti-virulence Therapeutic Strategies With a Focus on Dismantling Bacterial Membrane Microdomains, Toxin Neutralization, Quorum-Sensing Interference and Biofilm Inhibition. **Frontiers In Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 1-24, 2 abr. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2019.00074>.

MAURE, Alexandra; ROBINO, Etienne; HENST, Charles van Der. The intracellular life of *Acinetobacter baumannii*. **Trends In Microbiology**, v. 31, n. 12, p. 1238-1250, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2023.06.007>.

MCCANN, Malachy *et al.* Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phendio)₂]ClO₄ (phendio = 1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells. **Biometals**, v. 17, n. 6, p. 635-645, nov. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-004-1229-5>.

MCCANN, M. *et al.* Deciphering the Antimicrobial Activity of Phenanthroline Chelators. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2703-2714, 1 maio 2012. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/092986712800609733>.

MCCONNELL, Michael J.; ACTIS, Luis; PACHÓN, Jerónimo. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **Fems Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 130-155, mar. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x>.

MEA, Hing Jian *et al.* An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: motility, adherence and biofilm formation. **Microbiological Research**, v. 247, n. 1, p. 1-12, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2021.126722>.

MEADE, Elaine; SAVAGE, Micheal; GARVEY, Mary. Effective Antimicrobial Solutions for Eradicating Multi-Resistant and β -Lactamase-Producing Nosocomial Gram-Negative Pathogens. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 2-20, 21 out. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10111283>.

MICHAUD, Gaëlle *et al.* Overcoming antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using glycopeptide dendrimers. **Chemical Science**, v. 7, n. 1, p. 166-182, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5sc03635f>.

MINICHMAYR, I. K.; CLIMENT, V. A.; FRIBERG, L. E. Pharmacokinetic/pharmacodynamic models for time courses of antibiotic effects. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 60, n. 3, p. 1-6, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106616>.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Epidemiology And Infection**, v. 38, n. 6, p. 732-749, nov. 1938.

Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s002217240001158x>.

MOHAN, Bharti; CHOUDHARY, Mukesh. Synthesis, crystal structure, computational study and anti-virus effect of mixed ligand copper (II) complex with ONS donor Schiff base and 1, 10-phenanthroline. **Journal Of Molecular Structure**, v. 1246, n. 131246, p. 1-12, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131246>.

MARTÍNEZ, O. F.; CARDOSO, M. H.; RIBEIRO, S. M.; FRANCO, O. L. Recent Advances in Anti-virulence Therapeutic Strategies with a Focus on Dismantling Bacterial Membrane Microdomains, Toxin Neutralization, Quorum-Sensing Interference and Biofilm Inhibition. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 1- 24, 2 abr. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2019.00074>.

MOUBARECK, Carole Ayoub; HALAT, Dalal Hammoudi. Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. **Antibiotics**, v. 9, n. 3, p. 119, 12 mar. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics9030119>.

MOUSSOUNI, Malika *et al.* Activity of a Synthetic Peptide Targeting MgtC on *Pseudomonas aeruginosa* Intramacrophage Survival and Biofilm Formation. **Frontiers In Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2 abr. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2019.00084>.

MOUTON, Johan W. *et al.* Conserving antibiotics for the future: new ways to use old and new drugs from a pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 2, p. 107-117, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2011.02.005>.

MOZHAYSKIY, V.; TAGKOPOULOS, I. Microbial evolution in vivo and in silico: methods and applications. **Integr. Biol.**, v. 5, n. 2, p. 262-277, fev. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1039/c2ib20095c>.

MURRAY, Christopher J L *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, fev. 2022. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0).

NÁJERA, J. C. C.; RAMOS, U. G.; CAMACHO, H. B. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary klebsiella spp. phenotypes? **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1111-1123, 3 maio 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2017.1317412>

NIKOLIC, P.; MUDGIL, P.; WHITEHALL, J. The in vitro antibacterial effect of permethrin and formaldehyde on *Staphylococcus aureus*. **Microbiologyopen**, v. 9, n. 8, p. 1-10, 7 maio 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.1054>.

NODARI, Carolina Silva *et al.* Genomic Analysis of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Belonging to Major Endemic Clones in South America. **Frontiers In Microbiology**, v. 11, p. 1-14, 30 nov. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.584603>.

NORDMANN, Patrice; POIREL, Laurent. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 7, p. 521-528, 13 nov. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciz824>.

OLAR, R.; BADEA, M.; CHIFIRIUC, M. C. Metal Complexes - A Promising Approach to Target Biofilm Associated Infections. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 758-799, 24 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27030758>.

OLIVEIRA, Simone S. C. *et al.* The Anti-Leishmania amazonensis and Anti-Leishmania chagasi Action of Copper(II) and Silver(I) 1,10-Phenanthroline-5,6-dione Coordination Compounds. **Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 70-90, 1 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens12010070>.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. Geneva, 2017.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. Geneva, 2024.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *The Review on Antimicrobial Resistance*, n. May, p. 84, 2016.

O'SHAUGHNESSY, Megan *et al.* In Vivo Activity of Metal Complexes Containing 1,10-Phenanthroline and 3,6,9-Trioxaundecanedioate Ligands against Pseudomonas aeruginosa Infection in Galleria mellonella Larvae. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, p. 222-243, 21 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10020222>.

O'SHAUGHNESSY, Megan *et al.* Antibacterial activity of metal–phenanthroline complexes against multidrug-resistant Irish clinical isolates: a whole genome sequencing approach. **Jbic Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 153-171, 9 dez. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-022-01979-8>.

PALMER, Mary E. *et al.* The importance of pharmacokinetics and pharmacodynamics in antimicrobial drug development and their influence on the success of agents developed to combat resistant gram-negative pathogens: a review. **Frontiers In Pharmacology**, v. 13, n. 888079, p. 1-10, 25 jul. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.888079>.

PAPADOPOULOU, Martha *et al.* Characteristics of the Genetic Spread of Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii in a Tertiary Greek Hospital. **Genes**, v. 15, n. 4, p. 458, 5 abr. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes15040458>.

PELEG, Anton Y. *et al.* Galleria mellonella as a Model System to Study Acinetobacter baumannii Pathogenesis and Therapeutics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2605-2609, jun. 2009. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01533-08>.

PEREGRINO, Ingrid V. *et al.* Antibacterial activity and carbapenem re-sensitizing ability of 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its metal complexes against KPC-producing Klebsiella pneumoniae clinical strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 139-148, 4 maio 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/lam.13485>.

PEREIRA, Monalessa Fábila *et al.* Galleria mellonella as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. **Pathogens And Disease**, v. 78, n. 8, p. 1-15, 22 set. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftaa056>.

PILLONETTO, Marcelo *et al.* The Experience of Implementing a National Antimicrobial Resistance Surveillance System in Brazil. **Frontiers In Public Health**, v. 8, p. 1-20, 14 jan. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2020.575536>.

PORMOHAMMAD, Ali *et al.* Global prevalence of colistin resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii: a systematic review and meta-analysis. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, p. 103887, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103887>.

QI, Lihua *et al.* Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in Acinetobacter baumannii. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p. 1-10, 12 abr. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00483>.

RAKSHIT, Trilochan *et al.* A brief review on the antimicrobial activity of transition metal complexes with N,O donor chelating ligand. **Results In Chemistry**, v. 6, p. 1-9, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101224>.

RAMALINGAM, Karthikeyan; LEE, Valerie. Biotic and abiotic substrates for enhancing Acinetobacter baumannii biofilm formation: new approach using extracellular matrix and slanted coverslip technique. **The Journal of General and Applied Microbiology**,

v. 65, n. 2, p. 64-71, 2019. Microbiology Research Foundation. <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.2018.05.004>.

RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 70, p. 1–7, 2012.

RAMEZANALIZADEH, Fatemeh *et al.* Vaccination with a combination of planktonic and biofilm virulence factors confers protection against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 19909-19921, 19 nov. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-24163-z>.

RASKO, David A.; SPERANDIO, Vanessa. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p. 117-128, 18 jan. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3013>.

REED, Michael D. Optimal Antibiotic Dosing: the pharmacokinetic-pharmacodynamic. **Postgraduate Medicine**, v. 108, n. 7, p. 17-24, dez. 2000. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3810/pgm.12.2000.suppl10.52>.

RELLO, Jordi; BUNSOW, Eleonora; PEREZ, Antonio. What if there were no new antibiotics? A look at alternatives. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 12, p. 1547-1555, 6 out. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17512433.2016.1241141>.

RIGO, Graziela Vargas *et al.* Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole. **Parasitology**, v. 146, n. 9, p. 1179-1183, 12 set. 2018. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s003118201800152x>.

RIGO, Graziela Vargas *et al.* Peptidases Are Potential Targets of Copper(II)-1,10-Phenanthroline-5,6-dione Complex, a Promising and Potent New Drug against *Trichomonas vaginalis*. **Pathogens**, v. 12, n. 5, p. 745-763, 22 maio 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens12050745>.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **Fems Microbiology Letters**, v. 9, n. 1, p. 29-33, set. 1980. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x>.

ROY, Ranita *et al.* Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522-554, 27 fev. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>.

SAMMES, Peter G.; YAHIOGLU, Gokhan. 1, 10-Phenanthroline: a versatile ligand. **Chemical Society Reviews**, v. 23, n. 5, p. 327-334, 1994.

SAHA, Mousumi; SARKAR, Agniswar. Review on Multiple Facets of Drug Resistance: a rising challenge in the 21st century. **Journal Of Xenobiotics**, v. 11, n. 4, p. 197-214, 13 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jox11040013>.

SAHA, Ujjayni *et al.* Epsilon-poly-L-lysine inhibits biofilm formation and aids dispersion in *Acinetobacter baumannii*. **Medicine In Microecology**, v. 21, n. 100110, p. 1-8, set. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmic.2024.100110>.

SANTOS, A. L.S. *et al.* Antimicrobial Action of Chelating Agents: repercussions on the microorganism development, virulence and pathogenesis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 2715-2737, 1 maio 2012. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/092986712800609788>.

SHADAN, Afreen *et al.* Deciphering the virulence factors, regulation, and immune response to *Acinetobacter baumannii* infection. **Frontiers In Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1-18, 23 fev. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2023.1053968>.

SILVA, L. V. Avaliação do potencial sinérgico da combinação de vancomicina com outros antimicrobianos contra amostras de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos resistentes à oxacilina. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.

SILVA, L. V. Produção de atributos de virulência em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*: efeitos da 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre múltiplos processos biológicos. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ciências, Microbiologia – Instituto de Microbiologia

SKERNIŁKYTÈ, Jūratè *et al.* Surface-Related Features and Virulence Among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Belonging to International Clones I and II. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p. 1-16, 8 jan. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.03116>.

SOON, R. L. *et al.* Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 1, p. 126-133, 16 nov. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq422>.

SOUSA, Ingrid S. *et al.* Silver(I) 1,10-Phenanthroline Complexes Are Active against *Fonsecaea pedrosoi* Viability and Negatively Modulate Its Potential Virulence Attributes. **Journal Of Fungi**, v. 9, n. 3, p. 356, 15 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof9030356>.

SRIMANI, Jaydeep K *et al.* Drug detoxification dynamics explain the postantibiotic effect. **Molecular Systems Biology**, v. 13, n. 10, p. 1-11, out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.15252/msb.20177723>.

STEPANOVIĆ, Srdjan *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, abr. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6).

SUBHAN, M. A. *et al.* Spectroscopic Investigations, Anti-bacterial Activities and DNA-interactions of Metal Complexes (Cr(III), Zn(II), Ni(II)) Containing Phendione Ligand. **Journal Of Scientific Research**, v. 7, n. 3, p. 113-128, 1 set. 2015. Bangladesh Journals Online (JOL). <http://dx.doi.org/10.3329/jsr.v7i3.23270>.

TAY, Chiew Xsia *et al.* Matrix Metalloproteinase Inhibitor as an Antimicrobial Agent to Eradicate *Enterococcus faecalis* Biofilm. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 6, p. 858-863, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.01.032>.

TREBOSC, Vincent *et al.* Targeting virulence regulation to disarm *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 1868-1883, 19 out. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2022.2135273>.

TURNER, Raymond J. *et al.* The good, the bad, and the ugly of metals as antimicrobials. **Biometals**, v. 37, n. 3, p. 545-559, 19 dez. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-023-00565-y>.

VADING, M. *et al.* Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. **Plos One**, v. 13, n. 4, p. 1-13, 6 abr. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0195258>.

VALCEK, Adam *et al.* Phenotypic Characterization and Heterogeneity among Modern Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 14 fev. 2023. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.03061-22>.

VAN OS, Wisse; ZEITLINGER, Markus. Predicting Antimicrobial Activity at the Target Site: pharmacokinetic/pharmacodynamic indices versus time-to-kill approaches. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1485, 4 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10121485>.

VENTURA, Roberta F. *et al.* Antimicrobial action of 1,10-phenanthroline-based compounds on carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains: efficacy against planktonic- and biofilm-growing cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1703-1710, 31 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-020-00351-9>.

VERSCHOOR, J. A. *et al.* Polystyrene, Poly-L-Lysine and Nylon as Adsorptive Surfaces for the Binding of Whole Cells of *Mycobacterium Tuberculosis* H37 RV to Elisa Plates. **Journal Of Immunoassay**, v. 11, n. 4, p. 413-428, dez. 1990. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01971529008055042>.

VIGANOR, Livia *et al.* Anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity of 1,10-phenanthroline-based drugs against both planktonic- and biofilm-growing cells. **Journal Of**

Antimicrobial Chemotherapy, v. 71, n. 1, p. 128-134, 27 set. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkv292>.

VIGANOR, Livia *et al.* The Antibacterial Activity of Metal Complexes Containing 1,10-phenanthroline: potential as alternative therapeutics in the era of antibiotic resistance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 1280-1302, 23 fev. 2017. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/1568026616666161003143333>.

VIJAYAKUMAR, Saranya; BISWAS, Indranil; VEERARAGHAVAN, Balaji. Accurate Identification of Clinically Important Acinetobacter Spp.: an update. **Future Science Oa**, v. 5, n. 6, p. 395, 27 jun. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2144/fsoa-2018-0127>.

WAND, Matthew E. *et al.* Acinetobacter baumannii virulence is enhanced in Galleria mellonella following biofilm adaptation. **Journal Of Medical Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 470-477, 1 abr. 2012. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.037523-0>.

WANG, Yao-Kuan; KRASNOPEEVA, Ekaterina; LIN, Ssu-Yuan; BAI, Fan; PILIZOTA, Teuta; LO, Chien-Jung. Comparison of Escherichia coli surface attachment methods for single-cell microscopy. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 19 dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-55798-0>.

YAO, Yake; CHEN, Qi; ZHOU, Hua. Virulence Factors and Pathogenicity Mechanisms of Acinetobacter baumannii in Respiratory Infectious Diseases. **Antibiotics**, v. 12, n. 12, p. 1749, 18 dez. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics12121749>.

YU, Yichao; RÜPPEL, Diether; WEBER, Willi; DERENDORF, Hartmut. PK/PD Approaches. **Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology**, p. 1-23, 2019. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-56637-5_26-2.

YU, Chaoping; ZHAO, Wei; DUAN, Chujun; XIE, Jiangang; YIN, Wen. Poly-L-lysine-caused cell adhesion induces pyroptosis in THP-1 monocytes. **Open Life Sciences**,

v. 17, n. 1, p. 279-283, 1 jan. 2022. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/biol-2022-0028>.

ZHANG, Longfei *et al.* Pharmacodynamic Parameters of Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Integration Models. **Frontiers In Veterinary Science**, v. 9, n. 860472, p. 1-9, 24 mar. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2022.860472>.

ZHENG, Maochao *et al.* Poly(α -l-lysine)-based nanomaterials for versatile biomedical applications: current advances and perspectives. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 7, p. 1878-1909, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.12.001>.

ZHANEL, George G. *et al.* Cefiderocol: a siderophore cephalosporin with activity against carbapenem-resistant and multidrug-resistant gram-negative bacilli. **Drugs**, v. 79, n. 3, p. 271-289, fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-019-1055-2>.

10. Anexos

10.1 Manuscrito submetido à revista “Biometals”

In vitro efficacy and pharmacodynamics of novel 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metal compounds against *Acinetobacter baumannii* carbapenem-resistant and MDR clinical strains

Ingrid Vianez Peregrino^{1,2}, Roberta Ferreira Ventura Mendes^{1,3}, Luiz Felipe Vieira dos Santos Amorim¹, Michael Devereux⁴, Malachy McCann⁵, André Luís Souza dos Santos^{6*} and Ana Paula Ferreira Nunes^{1,2*}

¹ Department of Pathology, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

² Postgraduate Program in Infectious Diseases, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

³ Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

⁴ Centre for Biomimetic and Therapeutic Research, Focas Research Institute, Technological University Dublin, City Campus, Dublin, Ireland

⁵ Chemistry Department, Maynooth University, Maynooth, Co. Kildare, Ireland

⁶ Department of General Microbiology, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* Corresponding authors:

Ana Paula Ferreira Nunes, anastron@gmail.com;

André Luís Souza dos Santos, andre@micro.ufrj.br;

ORCID of the authors:

Ingrid Vianez Peregrino - 0000-0001-8716-796X

Ana Paula Ferreira Nunes - 0000-0001-7919-2938

Statements and Declarations

Competing Interests: The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – financial code 001).

Author contributions: All authors contributed to the study conception and design. Ingrid Vianez Peregrino, Roberta Ferreira Ventura and Luiz Felipe Vieira dos Santos Amorim performed the experiments. All authors analyzed the data. Ana Paula Ferreira Nunes and André Luís Souza dos Santos supervised the project. Resources were provided by Ana Paula Ferreira

Nunes, André Luís Souza dos Santos, Michael Devereux, and Malachy McCann. The first draft of the manuscript was written by Ingrid Vianez Peregrino, and all authors contributed to the final version of the manuscript.

Data availability: All data supporting the findings of this study are available within the paper and its Supplementary Information.

Acknowledgments

The authors extend their gratitude to all collaborators at the RESBAC Laboratory (Federal University of Espírito Santo), particularly Caio Ferrighetto and Gabriela Seabra, for their significant support in conducting parts of the experiments.

ABSTRACT

Continuous efforts are fundamental to develop new agents against rising antimicrobial resistance. Exploring early pharmacodynamics of antimicrobial candidates improves our understanding of exposure-efficacy relationship, thus enhancing drug development. Our research group focuses on 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione)-based complexes targeting critical pathogens. We have previously demonstrated the efficacy of Ag-phendione and Cu-phendione against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Here, we investigated the pharmacodynamics and thoroughly evaluated the efficacy of Cu-phendione and Ag-phendione against six clinical strains of multidrug-resistant *A. baumannii*. Bacterial time-kill assays revealed potent bactericidal effects at low concentrations and time-dependent killing, with Ag-phendione exhibiting slightly faster and more pronounced activity than Cu-phendione. Fractionated dosing strategies demonstrated sustained antimicrobial efficacy, as two doses of $0.5 \times \text{MIC}$ administered at a 6-hour interval resulted in bactericidal effects and eradicating all strains within 24 h. Variations in inoculum concentration minimally affected MIC values, confirming consistent killing activity across a wide range of bacterial densities. Both compounds, at a concentration of $3.12 \mu\text{g/mL}$, were able to eradicate more than 97% of the tested inocula. Both compounds exhibited short postantibiotic effects, with Ag-phendione showing slower growth recovery compared to Cu-phendione, resulting in average PAE durations of 1.857 h and 0.714 h, respectively. Synergy assays with meropenem and imipenem indicated predominantly additive effects and substantial reductions in bacterial counts. The modified disk-diffusion test did not show evidence of tolerance, persistence or heteroresistance. The study underscores promising antimicrobial properties of phendione-based complexes, supporting their development as effective treatments against MDR infections and providing a basis for further evaluations.

Keywords: 1,10-phenanthroline-5,6-dione; metal complexes; carbapenem-resistant bacteria; pharmacodynamics; synergy testing; antimicrobial resistance

Introduction

The escalating problem of antimicrobial resistance (AMR) has led to a critical shortage of effective therapeutic options, particularly against multi-drug resistant (MDR) bacterial infections, which pose a significant challenge for clinicians and serious threat to human health (Baran et al., 2023). In 2019, bacterial AMR was associated with an estimated 4.95M deaths, including 1.27M directly attributable to it (Murray et al., 2022). The six leading pathogens responsible for these deaths—*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*—accounted for 3.57 million deaths associated with resistance (Murray et al., 2022). Among these, carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) is particularly notorious for causing severe infections in healthcare settings, which are associated with high mortality rates due to their resistance to last-resort antibiotics (Cavallo et al., 2023; Li et al., 2024; Mancuso et al., 2023). The World Health Organization (WHO) has placed CRAB in the highest priority category for research and development of new antibiotics, highlighting the urgent need for innovative therapeutic alternatives (WHO, 2017; WHO, 2024). Currently, researchers are actively exploring new strategies to combat these critical pathogens, aiming to overcome the limitations of existing treatments and mitigate the devastating impact of AMR on public health (Gupta & Sharma, 2022; MacNair et al., 2023).

In response to the rapid rise of AMR and the challenges of developing antibiotics with novel modes of action, there has been a renewed interest in coordination complexes as potential antimicrobials, offering a promising alternative to traditional antibiotics (Evans & Kavanagh, 2021). The vast diversity of metals, ligands, and geometries in coordination compounds provides access to a largely unexplored research area, making these compounds particularly attractive for designing new antimicrobials (Rakshit et al., 2023). Their unique structural and electronic properties provide extensive biological and chemical diversity, contributing to multiple unique mechanisms of action that differentiate them from conventional organic antibiotics (Claudel, 2020; Frei et al., 2023). As a result, several metal-based antimicrobial compounds are advancing through clinical trials, and complexes are considered strong candidates for future clinically approved antibiotics (Frei et al., 2023; O'Shaughnessy et al., 2022). Central to this field are 1,10-phenanthroline (phen) and its derivative, 1,10-phenanthroline-5,6-dione (phendione), notable for their distinct structural features and versatility in forming stable complexes (Viganor et al., 2017). Transition metal complexes containing phen or its derivatives have demonstrated promising therapeutic capabilities against bacteria, fungi, parasites, and viruses, emerging as possible alternatives or additives to established antimicrobial therapeutics (Gandra et al. 2024; Mohan and Choudhary 2021; Oliveira et al. 2023; O'Shaughnessy et al., 2022; Viganor et al., 2016). (Gandra et al. 2024; Mohan and Choudhary 2021; Oliveira et al. 2023; O'Shaughnessy et al., 2022; Viganor et al., 2016).

The antibacterial activity of phen- and phendione-based complexes is characterized by a multimodal approach, primarily driven by their chelating properties, which selectively disturb essential metals necessary for bacterial metabolism and physiological processes (McCann et al. 2012; Santos et al., 2012). Moreover, metal-based compounds are known to interact with essential biomolecules such as DNA and proteins, potentially inhibiting critical cellular

functions, leading to cell death (Turner, 2023). It was demonstrated that both phen- and phendione-based complexes can induce bacterial DNA damage either directly by cleaving the DNA or indirectly by causing structural distortions that affect DNA integrity (Luís et al., 2014; Galdino et al., 2022). Additionally, these complexes have been shown to generate reactive oxygen species, contributing to oxidative damage within the bacterial cell (Galdino et al., 2022). The combined effects of these multiple mechanisms underscore the potent and versatile antimicrobial capabilities of phendione-based complexes. Our research group has investigated the antimicrobial potential of phendione and its complexes, particularly copper(II) ([Cu(phendione)₃](ClO₄)₂·4H₂O, Cu-phendione) and silver(I) ([Ag(phendione)₂]ClO₄, Ag-phendione). We have demonstrated that both metal-free phendione and its Cu-phendione and Ag-phendione complexes can inhibit the growth of *Pseudomonas aeruginosa* (Viganor et al., 2016), and carbapenemase-producing *A. baumannii* (Ventura et al., 2020) and *Klebsiella pneumoniae* (Peregrino et al., 2021).

Assessing the pharmacodynamic (PD) properties of an antimicrobial candidate early in development is crucial for understanding its mechanisms of action, optimizing therapeutic outcomes and mitigating resistance risks (Mozhayskiy; Tagkopoulos, 2013). This approach reduces the time and cost required for drug development and increases the likelihood of success in later clinical trials. Nonclinical PD experiments that elucidate the time-course of antimicrobial effects and the pattern of bacterial killing/regrowth provide a more comprehensive understanding of the compound's therapeutic potential beyond traditional minimum inhibitory concentration (MIC) measurements (Minichmayr et al., 2022; Rodríguez-Gascón et al., 2021). While MIC is a valuable indicator of antimicrobial potency, it has limitations due to its static concentration conditions, which do not reflect the dynamic *in vivo* environment (Yu et al., 2019). Additionally, the MIC determined by twofold dilutions is a relatively imprecise measure, as different patterns of bacterial growth and killing kinetics in response to the antimicrobial agent can result in the same MIC (van Os; Zeitlinger, 2021; Yu et al., 2019). More advanced PD assessments are necessary to determine antimicrobial activity profiles (bacteriostatic x bactericidal; concentration-dependent x time-dependent), bacterial killing rates and duration of post-antibiotic effects when concentrations fall below the MIC (Lister, 2006; Rodríguez-Gascón et al., 2021). Summarily, early PD evaluations play a pivotal role in identifying the parameters influencing clinical efficacy, setting optimal targets for achieving maximum therapeutic effect, and ensuring the best conditions for subsequent clinical trials (Bissantz et al., 2024; Jorda; Zeitlinger, 2020; Palmer et al., 2022).

The present study first aims to characterize the PD profile of the antibacterial activity of Cu-phendione and Ag-phendione against *A. baumannii*. We also aimed to deeper evaluate the efficacy of these metal-based compounds, explore their potential synergistic effects when combined with carbapenems, and determine the propensity to resistance development. By advancing our understanding of these novel agents, we hope to contribute to the development of innovative therapeutic strategies to combat infections caused by *A. baumannii* and other MDR critical pathogens, addressing a critical gap in current treatment options.

2. Material and methods

2.1 Bacterial strains

A set of six *A. baumannii* clinical strains was obtained from a previously characterized collection of 26 MDR and carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates (Ventura et al., 2020). Based on their genotypic profiles, susceptibility patterns, and MIC values for carbapenems and phendione-based complexes, the six clinical strains (3B, 30B, 38B, 78B, 98B and 101B) were selected to constitute a representative and diverse group. Additionally, the carbapenem-susceptible reference strain *A. baumannii* ATCC 19606 (American Type Culture Collection) was included in the tests.

2.2 Test Compounds

The phendione-based complexes $[\text{Cu}(\text{phendione})_3](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Cu-phendione) and $[\text{Ag}(\text{phendione})_2]\text{ClO}_4$ (Ag-phendione) were prepared following published methods (McCann et al., 2004). The compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide and stored at room temperature in the dark.

2.3 Dose-response curves

The antimicrobial activity and PD of Ag-phendione and Cu-phendione were assessed using time-kill assays (TKA), conducted at different compound concentrations to create dose-response curves, following the procedure outlined by Zhou et al. (2013), with minor adjustments. In brief, phendione-based complexes were diluted in Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth (CAMHB) to concentrations corresponding to 0.25x, 1x, 4x, and 16xMIC. Bacterial suspensions in the logarithmic phase were then inoculated, standardized to an initial inoculum of approximately 1×10^6 CFU/mL. The cultures were incubated at 35°C, and samples were taken for viable counts at 0, 3, 6, 9, 12, and 24 h. These samples were appropriately diluted in 0.85% NaCl and plated on Mueller-Hinton Agar (MHA) using the Drop Plate Method (Miles, Misra, and Irwin, 1938). Colonies were manually counted after 18-20 h of incubation at 35 °C and expressed as log₁₀ CFU/mL. The resulting data were used to plot curves of CFU/mL over time, revealing distinct curves for each compound concentration.

2.4 Fractionated dosing effects

A short dose fractionation was simulated for Ag-phendione and Cu-phendione, to elucidate the kinetics of antimicrobial action at doses below the MIC, with multiple applications. Two doses, each equivalent to 0.5xMIC, were dispensed at a 6-hour interval, following the proposed by Silva (2009) with modifications. Test cultures were prepared by diluting the compounds in CAMHB, followed by inoculation with a bacterial suspension (to a final concentration $\sim 10^6$ CFU/mL), similar to the previously described procedure. After the designated time interval, the compounds were re-applied in concentrations and volumes adjusted to maintain the culture's final concentration at 0.5xMIC. The cultures were incubated at 35°C, and at fixed time points (0, 3, 6, 9, 12, and 24 h), samples were collected for viable counts, using the Drop Plate Method (Miles, Misra, and Irwin, 1938). The results were graphically represented with log₁₀ values of CFU/mL versus time.

2.5 Post antibiotic effect (PAE)

PAE experiments were performed according to the method of D'Atanasio et al. (2020), with some adaptations, by exposing the bacteria ($\sim 10^7$ CFU/mL) to concentrations of 1x, 5x and 10xMIC of Ag-phendione e Cu-phendione for 1 h. Following the short exposure, viable counts were determined using the Drop Plate Method (Miles, Misra, and Irwin, 1938). The compounds were removed by diluting the bacterial cultures (1:1000) in CAMHB. The compound-free cultures were then re-incubated at 35° C, and viable counts were performed hourly for 5 h. A growth control, prepared and diluted in a similar way to the test solution but without being exposed to phendione-based complexes, was included in each experiment. The PAE was determined by the difference of the time for the compound-treated culture to grow one log unit (T), from the time zero, and the time for the control (compound-free culture) to grow one log unit (C) [PAE(h)=T-C], as previously described (Craig and Gudmundsson, 1996).

2.6 Effect of CFU concentration on MIC

The impact of inoculum concentration on the MIC values of phendione-based complexes was determined following the methodology outlined by Jangra et al. (2019). Ag-phendione and Cu-phendione were diluted in CAMHB to obtain concentrations ranging from 0.78 to 50 µg/mL. The MIC value was determined to five different inoculum concentrations (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 CFU/mL), obtained from bacterial cultures inoculated into sterile saline solution with turbidity adjusted to an OD₆₀₀ of 0.25 ($\sim 10^9$ CFU/mL). The microplates were incubated at 35°C for 20-24 h. After incubation, a resazurin solution was added to all wells, and the plate was incubated again, for one more hour. Color change in the wells was verified, and MIC values were determined as the lowest concentration at which no color change was observed. The experiments were replicated biologically three times, and for each tested strain, the initial inoculum suspension concentration was confirmed at least once by viable count using the Drop Plate Method (Miles, Misra, and Irwin, 1938).

2.7 Synergy assays

2.7.1 Checkerboard

Combinations of phendione-based complexes with meropenem (MEM) and imipenem (IMP) against *A. baumannii* were evaluated using the Broth Microdilution Checkerboard Method, following Peregrino et al. (2020). The tested combinations included Ag-phendione + MEM, Cu-phendione + MEM, Ag-phendione + IMP, and Cu-phendione + IMP. In summary, six two-fold dilutions of each compound were dispensed in a 96-well microtiter plate in a checkerboard arrangement to allow for all possible concentration combinations (Pilai et al., 2005). Subsequently, the plate was inoculated with a bacterial suspension to a final concentration of 10^5 CFU/mL, incorporating growth and sterility controls. The results were interpreted through the values of fractional inhibitory concentration (FIC) for each agent at a given combination concentration, and mostly the FIC index (FICI), representing the cumulative FIC of both agents. Synergy was defined as a FICI ≤ 0.5 , additivity as a FICI >0.5 but <2 , indifference as a FICI ≥ 2 but <4 , and antagonism as a FICI >4 . The test was conducted with at least three biological replicates.

2.7.2 Combination Time-kill

To confirm the activity of combinations of MEM with the phendione-based complexes, a TKA was performed by the microdilution method, following the protocol described by Peregrino et al. (2021). Briefly, concentrations of $0.5 \times \text{MIC}$ for each agent alone and the two agents in combination were inoculated with a 10^6 CFU/mL bacterial suspension and incubated at 35 ± 2 °C. Samples (10 μL each) were taken at intervals of 0, 3, 6, 9, 12, and 24 h, and subjected to ten-fold serial dilutions in 0.85% (w/v) saline. Diluted samples were then plated onto MHA and incubated at 35 ± 2 °C for 18 h. The results were interpreted in accordance with established guidelines (CLSI, 1999). Synergistic effects were defined as a ≥ 2 log₁₀ CFU/mL reduction in bacterial growth for the combination compared to the most active single agent at 24 h. Antagonism was identified by a ≥ 2 log₁₀ CFU/mL increase in growth after 24 h between the combination and the most active single agent. Indifference was defined as a < 2 log₁₀ CFU/mL change at 24 h by the combination relative to the most active single agent. In addition, bacteriostatic and bactericidal activity was investigated, being defined as < 3 log and ≥ 3 log₁₀ reductions in CFU/mL, respectively, compared to the initial bacterial count. Due to the limitations of the microdilution, inoculum concentrations below 10^3 CFU/mL could not be detected, being identified as a lack of growth. To confirm the possible eradication of the tested isolates, an aliquot (10 μL), taken directly from the microplate well after the last reading (24 h), was sub-cultured on MHA plate. Plates were incubated for 24 h at 37 °C and any observance of colony growth negated the interpretation of inoculum eradication by the test combination.

2.8 Development of inducible resistance

2.8.1 Modified disk-diffusion assay

The presence of tolerance, persistence and heteroresistance were investigated using the Modified disk-diffusion assay, also referred to as the "TDtest", adapted from Gefen et al. (2017). Sterile discs of filter paper (6 mm diameter) were prepared and subsequently impregnated with 5 μL of Ag-phendione or Cu-phendione solution at 1000 $\mu\text{g/mL}$. The concentration of the phendione-compounds applied to the discs was determined after a preliminary evaluation of halo sizes produced by different compound concentrations. After air-drying, the discs containing the phendione-based complexes were placed on MHA plates previously inoculated with the study strains ($\approx 1.5 \times 10^8$ CFU/mL) using a sterile swab. Following 24 h of incubation at 35°C, during which inhibitory halos formed around the discs, they were removed and replaced with new paper discs impregnated with 5 μL of sterile 40% glucose solution. The plates were then reincubated for an additional 24 h under the same conditions and examined for colony growth within the inhibition zone. Also, the diameters of the halos formed after both incubations were measured and compared. Finally, the MIC of Ag-phendione and Cu-phendione was determined for the subpopulations isolated within the inhibition zone using the broth microdilution method, following the protocol of Viganor et al. (2015). Two biological replicates were included in the tests.

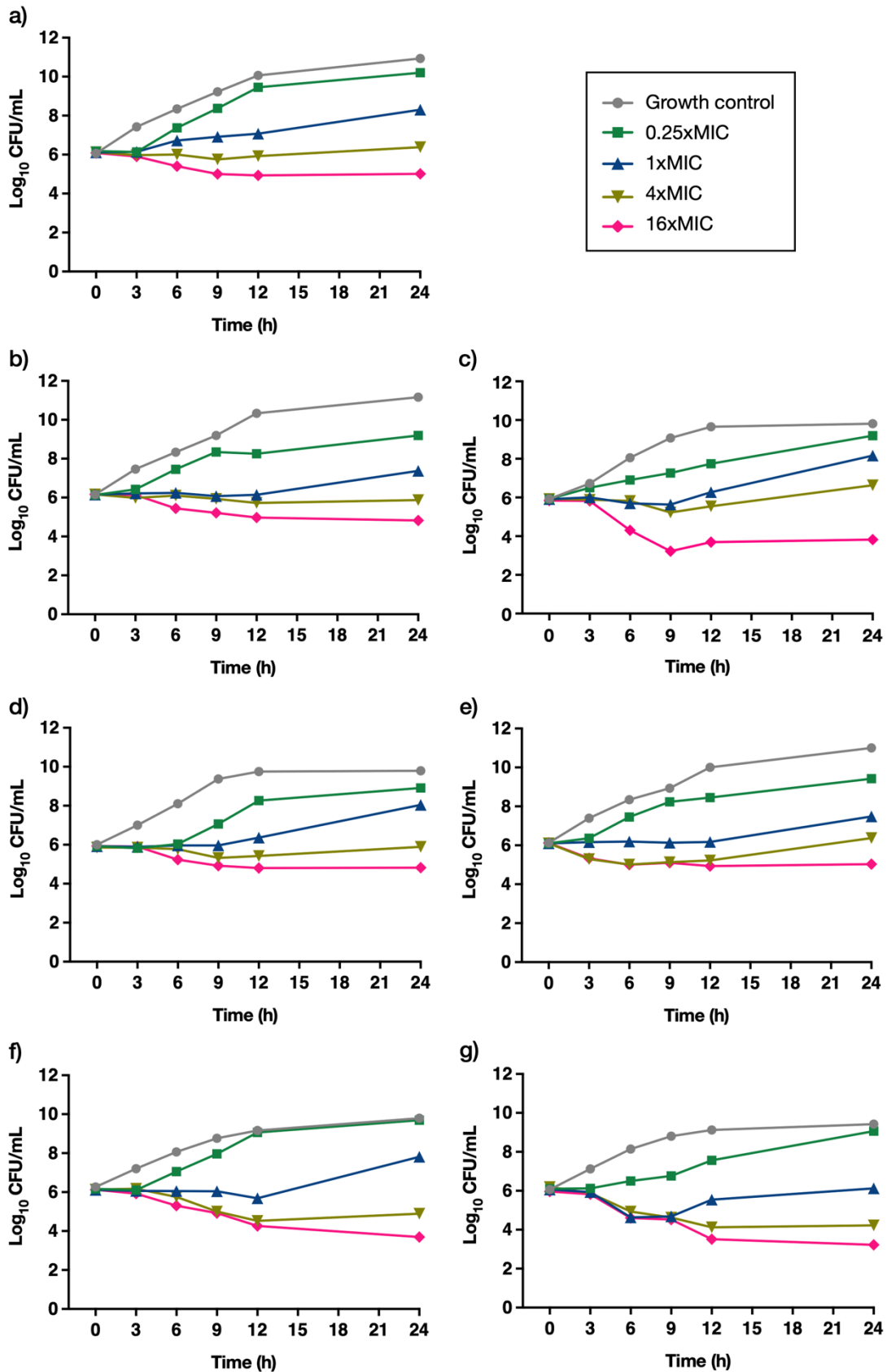
3. Results and discussion

3.1 Dose-response curves

The antimicrobial activity profiles of Ag-phendione and Cu-phendione were assessed from dose-response curves, revealing key PD characteristics, including the presence of a bactericidal effect, and the relationship between compound activity, dose, and time. The lower detection limit was determined to be 10^2 CFU/mL. The results revealed a consistent reduction in bacterial growth across all concentrations and time intervals, highlighting the robust bactericidal activity of both compounds. Cu-phendione achieved an approximately 3-log reduction in bacterial growth within 9 or 12 h at concentrations of 1x, 4x, and 16xMIC (Fig. 1). In comparison, Ag-phendione exhibited a similar reduction at concentrations of 1x and 4xMIC but demonstrated a faster response, achieving the 3-log reduction within only 6 h (Fig. 2). Notably, at the 16xMIC concentration of Ag-phendione, a reduction exceeding 5 logs was observed. The slightly distinct response profile of Ag-phendione at the highest concentration tested could be attributed to the activity of silver present in this compound, as silver itself has well-documented antimicrobial properties (Frei et al., 2023).

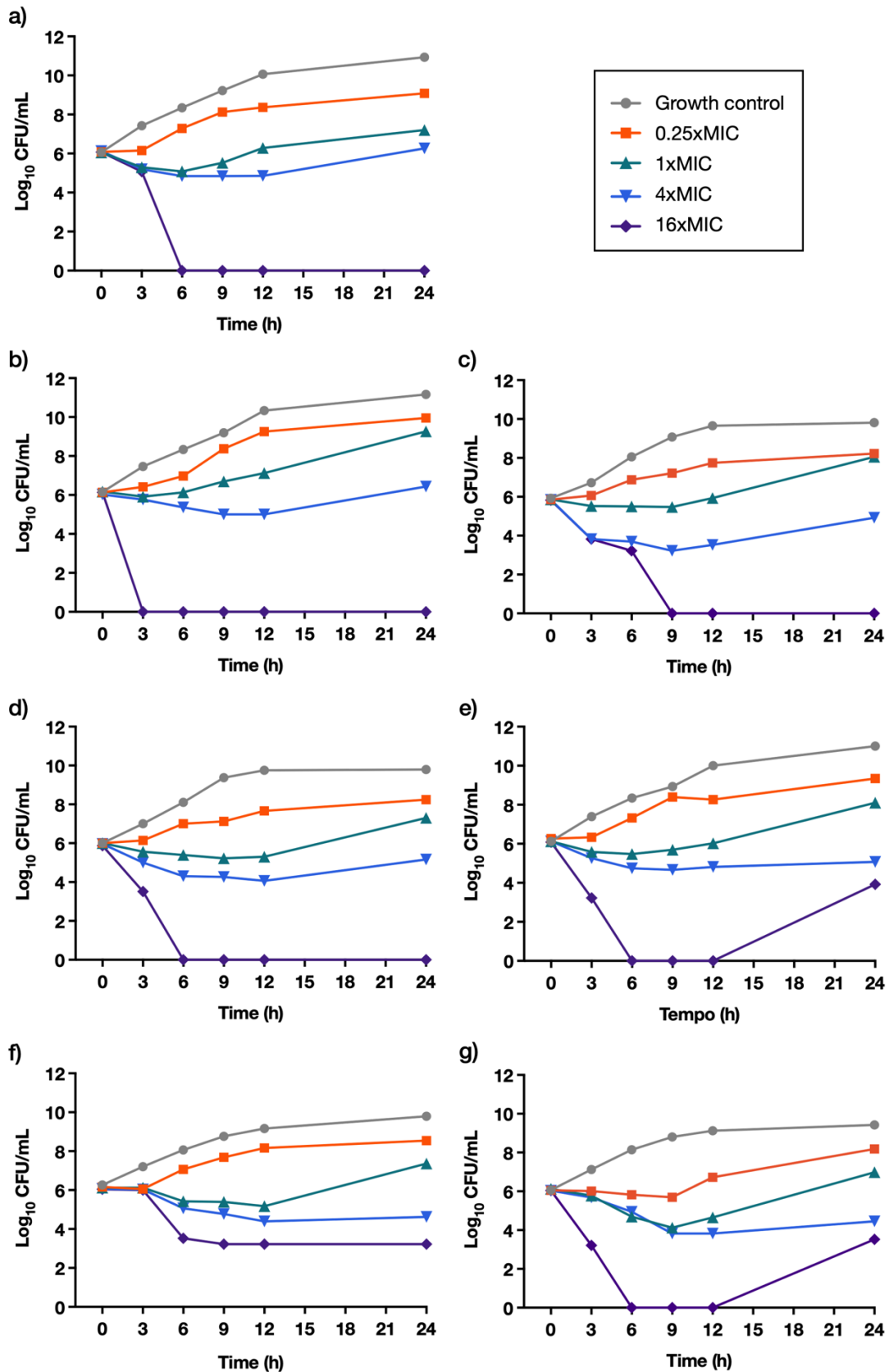
Although consistently demonstrating bactericidal activity at concentrations starting from 1xMIC, the rate of bacterial growth reduction was not linearly affected by the compound concentration, especially in the initial hours of the test. These findings indicate that while increasing the dose does not proportionally enhance antimicrobial efficacy, time-dependent factors significantly influence the activity of both Ag-phendione and Cu-phendione. Given that time-dependent antimicrobials allow for greater flexibility in designing dosing regimens, this characteristic appears to be advantageous for the prospective development of phendione-based complexes into antimicrobial drugs.

Fig. 1 Effects of Cu-phenidone on the growth of 6 clinical strains of *A. baumannii* and the reference strain ATCC 19606



a) – 3B; b) – 30B; c) – 38B; d) – 78B; e) – 98B; f) – 101B; g) - ATCC 19606

Fig. 2 Effects of Ag-phenidone on the growth of 6 clinical strains of *A. baumannii* and the reference strain ATCC 19606

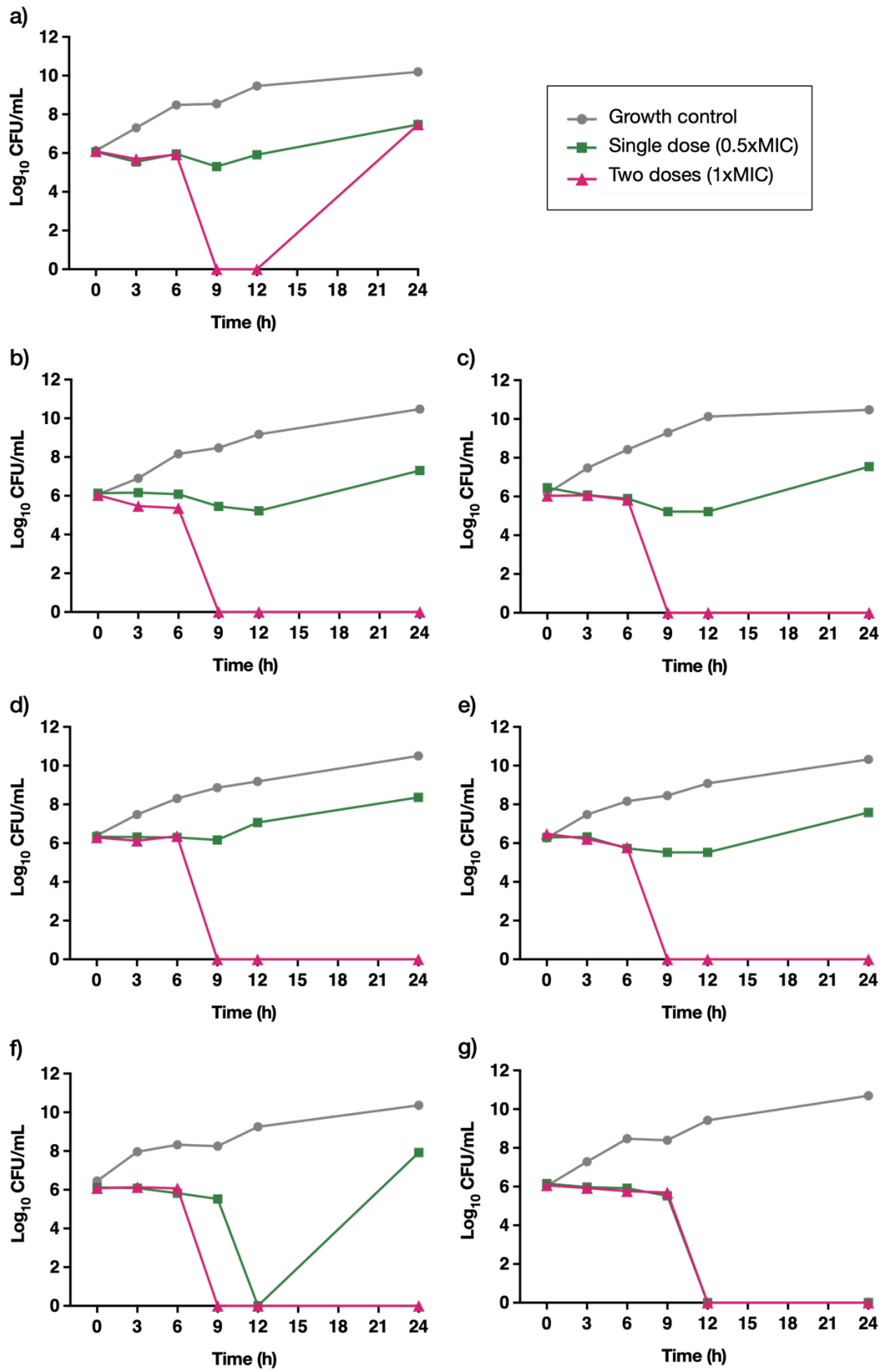


a) – 3B; b) – 30B; c) – 38B; d) – 78B; e) – 98B; f) – 101B; g) - ATCC 19606

3.2 Fractionated dosing effects

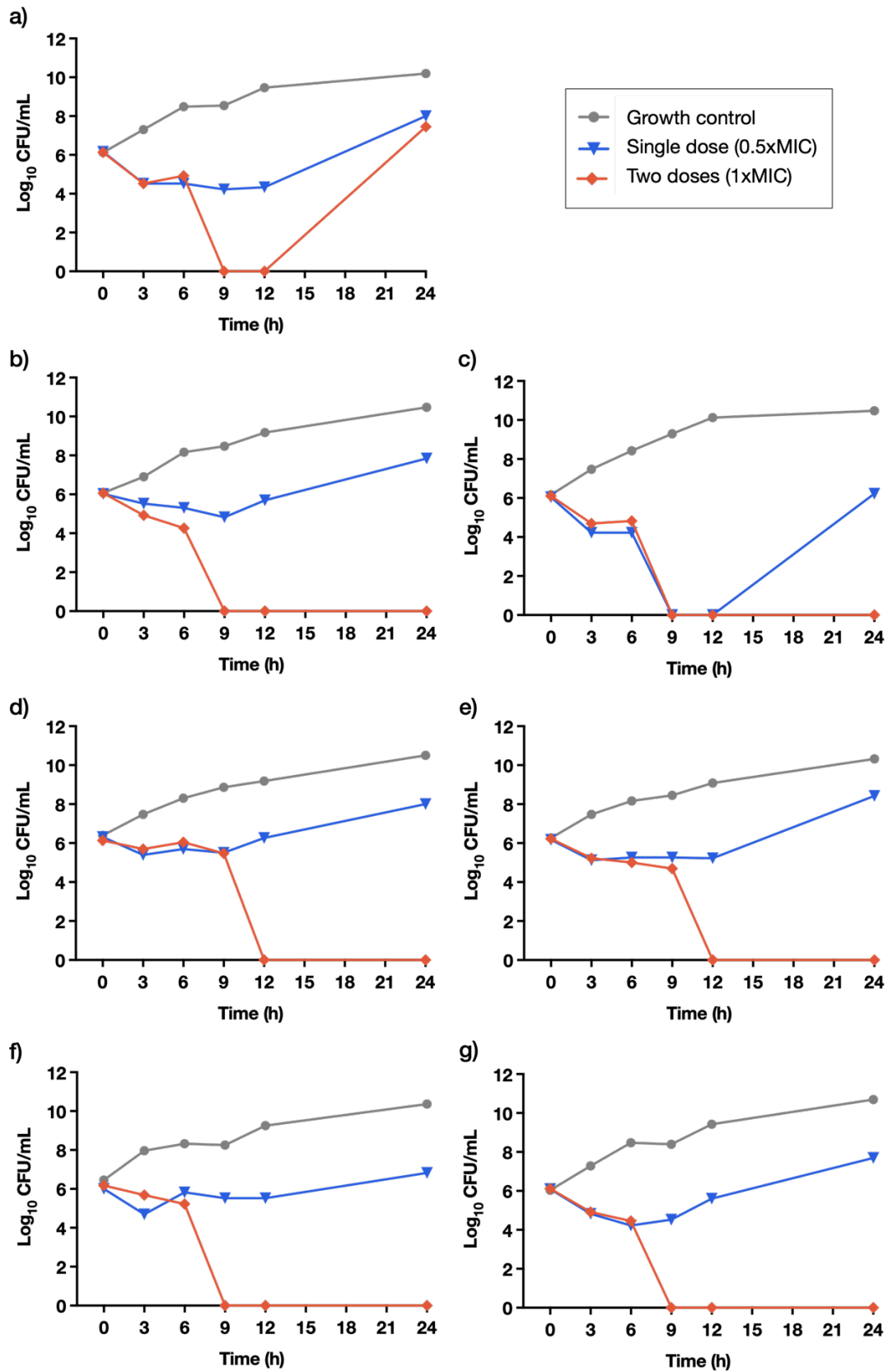
To explore the impact of hypothetical dose fractionation, phendione-based complexes were tested with regimens equivalent to 1xMIC, divided into two doses of 0.5xMIC and administered at a 6 h interval. The results obtained with Cu-phendione indicated a modest reduction in viable cell count until the second dose was administered, at which point a substantial reduction of at least 3 log₁₀ was spotted (Fig. 3). In contrast, Ag-phendione demonstrated a distinct response to dose fractionation (Fig. 4). Following the first application, a reduction of 1 to 2 log₁₀ compared to the initial inoculum was noted for most strains, with minimal population changes observed only in the 38B strain (Fig. 4C). However, the bactericidal effect was evident after the second application, with a population reduction of at least 3 log₁₀ compared to the control. This suggests that Ag-phendione may exhibit a more rapid initial response to the fractionated dosing regimen. The observed bactericidal activity was further validated by the eradication of viable cells, occurring for both compounds within 3 h after redosing (9 h after the first dose) for mostly strains (except for strain 101B with Cu-phendione and strains 38B and 78B with Ag-phendione, where it occurred 6 h after the second dose). Despite differences in response between Cu-phendione and Ag-phendione, both compounds demonstrated the ability to exert significant bactericidal effects with fractionated dosing. These findings demonstrate the therapeutic advantages of phendione-based complexes through prolonged exposure to subinhibitory concentrations, enabling lower doses to achieve significant antimicrobial effects while mitigating potential toxicity and side effects.

Fig. 3 Effects of fractionated-dosing of Cu-phenidone against 6 clinical strains of *A. baumannii* and the reference strain ATCC 19606



a) – 3B; b) – 30B; c) – 38B; d) – 78B; e) – 98B; f) – 101B; g) - ATCC 19606

Fig. 4 Effects of fractionated-dosing of Ag-phenidone against 6 clinical strains of *A. baumannii* and the reference strain ATCC 19606



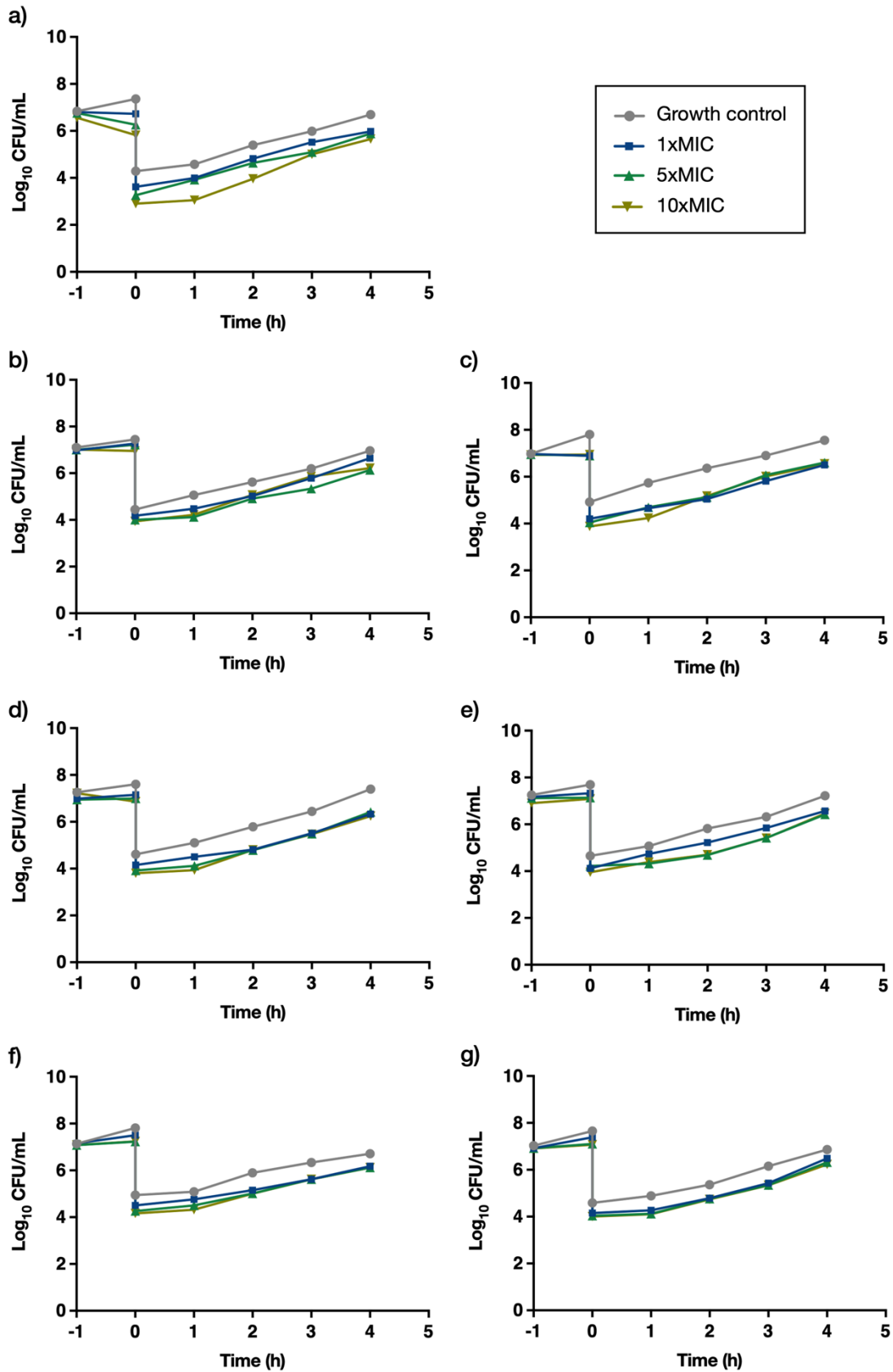
a) – 3B; b) – 30B; c) – 38B; d) – 78B; e) – 98B; f) – 101B; g) - ATCC 19606

3.3 Post antibiotic effect (PAE)

The assessment of PAE for Cu-phendione and Ag-phendione provided valuable insights. Using the specified formula, the duration of PAE was calculated at the optimal bactericidal concentration of 5xMIC. The results indicated a short duration for both compounds, with average durations of 0.714 ± 0.488 h for Cu-phendione and 1.857 ± 0.378 h for Ag-phendione. Although Ag-phendione showed an average PAE only 1.143 h longer than Cu-phendione, the graphs reveal a substantial difference in the regrowth dynamics of the two compounds (Figs. 5 and 6). The 1-hour variation in average values may be underestimated due to the limitations of the classic PAE methodology, which generates time series data without continuous coverage throughout the experiment. Recognizing these limitations, Srimani et al. (2017) emphasized the challenges of obtaining sparse and temporally imprecise data in PAE assessments. Nevertheless, if graphical analysis takes precedence over numerical analysis, it becomes evident that Ag-phendione (Fig. 6) exhibits a considerably longer PAE duration compared to Cu-phendione (Fig. 5). This distinction is crucial in understanding the specific characteristics of these novel compounds, guiding to formulation of potential dosing regimens for further *in vivo* tests and clinical trials.

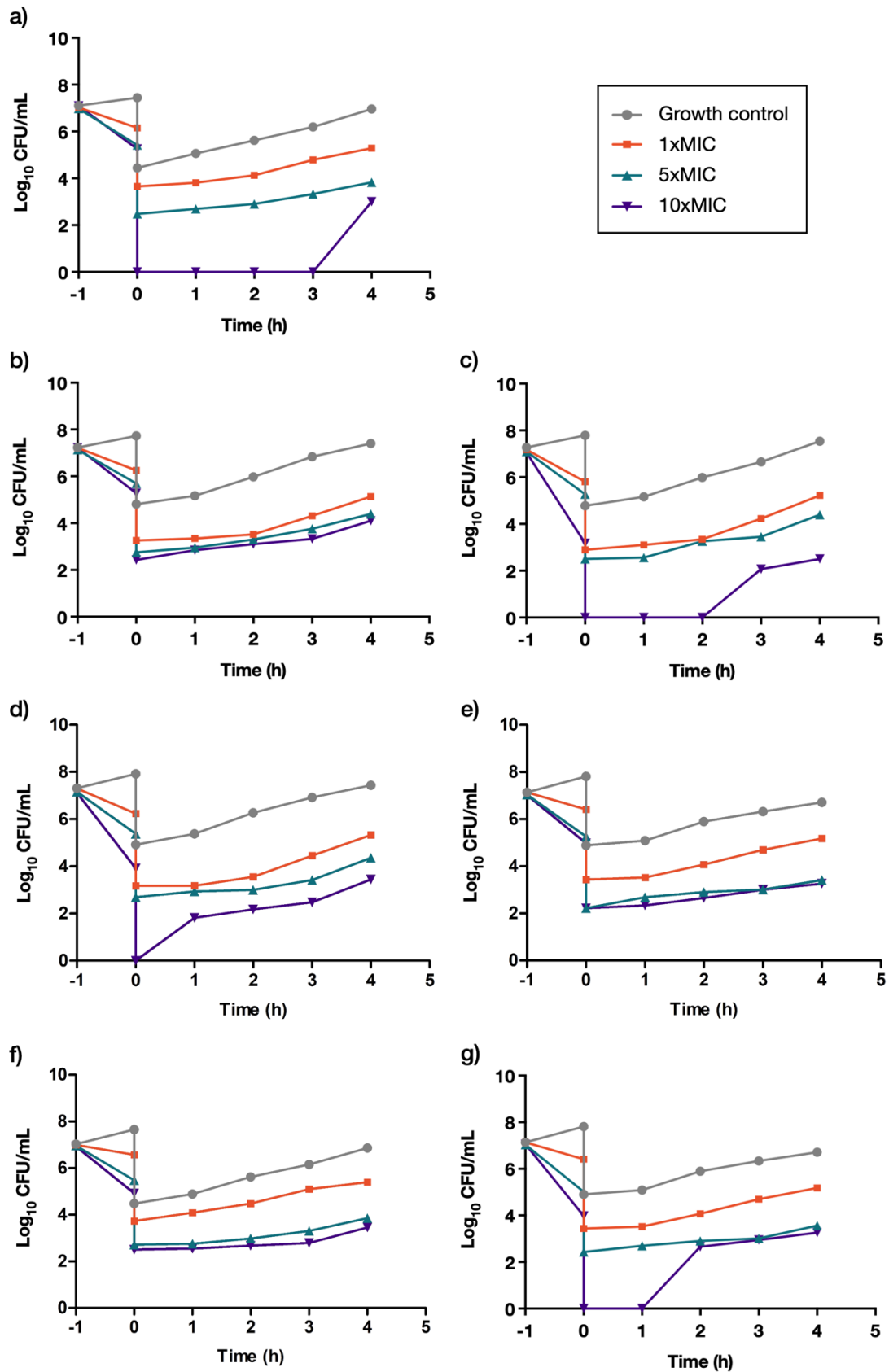
Additionally, PAE curves were determined for the classical antibiotics MEM and ciprofloxacin (CIP) aiming to establish comparative parameters with the novel phendione-based complexes (Fig s1 – supplementary information). The results showed that the growth recovery dynamics for Cu-phendione closely resembled that of MEM, which is known to induce a moderate PAE in Gram-negative bacteria (PAI et al., 2015). In contrast, the PAE curves of Ag-phendione exhibited a similar profile to that of CIP, characterized for prolonged recovery times, expressively influenced by increasing concentrations (PAI et al., 2015). These findings not only contribute to our understanding of the PAE characteristics of phendione-complexes but also underline their correlation with conventional antimicrobials, offering valuable insights for future stages of development and testing processes.

Fig 5. Postantibiotic effect induced by a 1-hour exposure to Cu-phendione of 6 clinical strains of *A. baumannii* and the reference strain ATCC 19606



a) – 3B; b) – 30B; c) – 38B; d) – 78B; e) – 98B; f) – 101B; g) - ATCC 19606

Fig 6. Postantibiotic effect induced by a 1-hour exposure to Ag-phenidone of 6 clinical strains of *A. baumannii* and the reference strain ATCC 19606



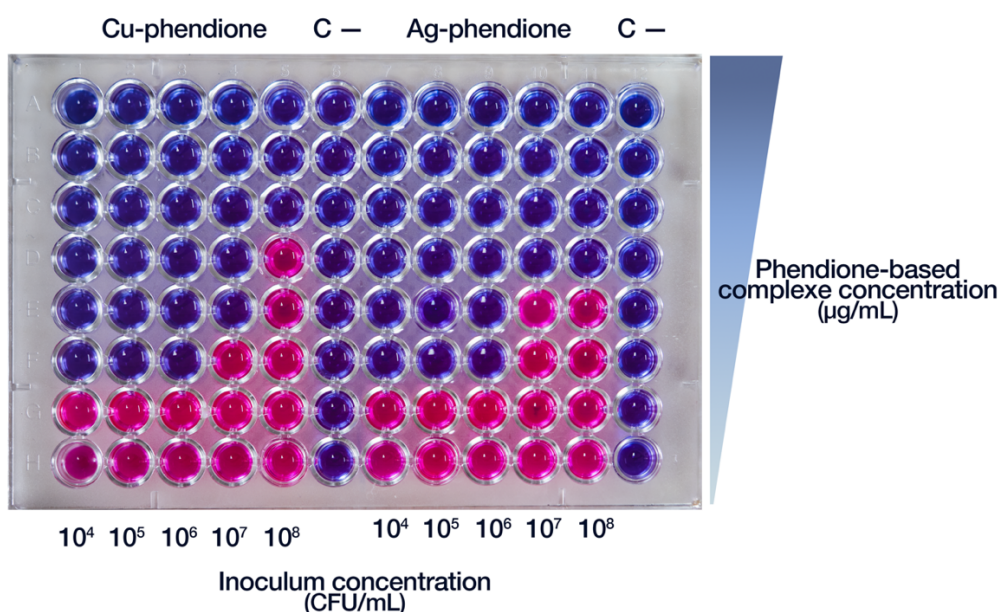
a) – 3B; b) – 30B; c) – 38B; d) – 78B; e) – 98B; f) – 101B; g) - ATCC 19606

3.4 Effect of CFU concentration on MIC

The impact of inoculum concentrations on the MIC of phendione-based complexes was investigated, revealing that escalating inoculum concentrations did not proportionally affect the MIC values (Fig. 7). Despite a 100-fold increase in CFU, the MIC values remained unchanged for all tested clinical strains, indicating a strong and consistent inhibitory effect even under high bacterial loads (Table s1 – supplementary information). Similarly, Jangra et al. (2019) observed the consistent effects of tridecaptin M peptide against a *K. pneumoniae* strain, maintaining a MIC value of 4 $\mu\text{g/mL}$ for inocula ranging from 10^5 to 10^7 CFU/mL.

The progressive nature of CFU increments is noteworthy. Consequently, more substantial increases in MIC were observed in the greater increments of inoculum, from 10^6 to 10^7 CFU/mL and from 10^7 to 10^8 CFU/mL, as expected. Nevertheless, the final cumulative increment, equivalent to approximately 9.99×10^7 CFU/mL (from 10^4 to 10^8 CFU/mL), raised the MIC values by up to 2.34 $\mu\text{g/mL}$ (from 0.78 to 3.12 $\mu\text{g/mL}$) in 92.9% of all tested conditions. Finally, considering both compounds, the concentration of 3.12 $\mu\text{g/mL}$ (equivalent to 3.2 μM for Cu-phendione and 5 μM for Ag-phendione) was capable of eradicating over 98% of all tested inocula. The ability of phendione-based complexes to maintain a substantial antimicrobial effect despite increased inoculum concentrations sets them as promising candidates for further exploration in the development of potent antibacterial agents.

Fig. 7 Representative microtiter plate illustrating the effects of varied inoculum concentrations on MIC values of Cu-Phendione and Ag-Phendione



3.5 Synergy assays

3.5.1 Checkerboard

The checkerboard method was employed to assess the efficacy of phendione-based complexes in combination with carbapenems across a wide range of concentrations, providing a comprehensive evaluation of these combinations' effects. The MIC and FICI values corresponding to the most effective combined concentration for each strain are presented in Tables 1 and 2, representing MEM and IMP combinations, respectively. The criteria used to define the most effective concentrations were: (1) the presence of synergistic effect; and (2) reduction of the MIC values of the carbapenems, in combination with the compounds, to values lower than the cutoff points that define resistance according to CLSI (2024). The calculated FICI values for the combinations of both Ag-phendione and Cu-phendione with IMP exhibited a range from 0.5 to 1, indicating the consistent presence of synergistic or additive effects in all tested strains. While MEM combinations produced only additive effects, IMP combinations generated synergistic effects in 28.57% and 14.29% of strains when tested with Ag-phendione and Cu-phendione, respectively. Similarly, Peregrino et al. (2021) demonstrated the *in vitro* success of Ag-phendione and Cu-phendione combined with carbapenems against clinical strains of *K. pneumoniae*. Using the checkerboard method, they observed mainly additive effects for IMP combinations, while combinations of MEM showed a high rate of synergism. The findings of the present study align with this previous work on *K. pneumoniae*, as both studies showed no indifferent or antagonistic effects. This reinforces the clinical potential of combining carbapenems with phendione-based complexes.

To confirm the predominant occurrence of additive effects, five additional strains from the original collection of 26 *A. baumannii* clinical isolates were included in the checkerboard test (data not shown). The results from these strains revealed only additive effects across all tested combinations, coherent with our previous findings. Furthermore, the observed additive effects are particularly noteworthy due to the reductions in MEM MIC values achieved with the combinations. For MEM + Ag-phendione combination, MIC values of MEM were reduced fourfold and eightfold for 45.45% (5/11) and 18.18% (2/11) of clinical strains, respectively. Similarly, MEM + Cu-phendione combination provided a fourfold reduction in MIC values for 36.36% (4/11) of clinical strains. The substantial reductions in MEM MIC values brought them below the resistance breakpoint for 27.27% (3/11) of clinical strains, aligning with the intermediate category, according to CLSI (2024). These findings reinforce the potential clinical significance of combining MEM or other clinical antibiotics with phendione-based complexes, especially when the efficacy of the antibiotic alone may be compromised due to resistance concerns.

Table 1 Synergy testing by checkerboard method of meropenem + phendione-based complexes against 6 clinical strains of *A. baumannii* and the reference strain ATCC 19606

Strains	MIC of single agents ($\mu\text{g/mL}$)			MIC of the combination (FICI value)	
	MEM	Ag-phendione	Cu-phendione	MEM/Ag-phendione	MEM/Cu-phendione
3B	32	0.78	1.56	16/0.39 (1) ^b	16/0.78 (1) ^b
30B	32	1.56	1.56	16/0.39 (0.75) ^b	8/0.78 (0.75) ^b
38B	16	1.56	1.56	8/0.39 (0.75) ^b	4/0.78 (0.75) ^b
78B	16	1.56	1.56	4/0.78 (0.75) ^b	8/0.39 (0.75) ^b
98B	64	0.78	1.56	16/0.39 (0.75) ^b	16/0.78 (0.75) ^b
101B	64	1.56	1.56	16/0.78 (0.75) ^b	16/0.78 (0.75) ^b
ATCC	1	1.56	1.56	0.5/0.78 (1) ^b	0.25/0.78 (0.75) ^b

MEM – meropenem; ATCC – reference strain ATCC 19606; ^a – synergy; ^b – additivity

Table 2 Synergy testing by checkerboard method of imipenem + phendione-based complexes against 6 clinical strains of *A. baumannii* and the reference strain ATCC 19606

Strains	MIC of single agents ($\mu\text{g/mL}$)			MIC of the combination (FICI value)	
	IMP	Ag-phendione	Cu-phendione	IMP/Ag-phendione	IMP/Cu-phendione
3B	64	1.56	1.56	32/0.39 (0.75) ^b	32/0.78 (1) ^b
30B	32	1.56	1.56	8/0.78 (0.75) ^b	8/0.39 (0.5) ^a
38B	16	1.56	1.56	4/0.39 (0.5) ^a	4/0.39 (0.5) ^a
78B	16	1.56	1.56	4/0.39 (0.5) ^a	8/0.78 (1) ^b
98B	32	0.78	1.56	8/0.39 (0.75) ^b	8/0.39 (0.75) ^b
101B	64	0.78	1.56	32/0.19 (0.75) ^b	16/0.78 (0.75) ^b
ATCC	1	1.56	1.56	0.5/0.78 (1) ^b	0.5/0.78 (1) ^b

IMP – imipenem; ATCC – reference strain ATCC 19606; ^a – synergy; ^b – additivity

3.5.2 Combination time-kill

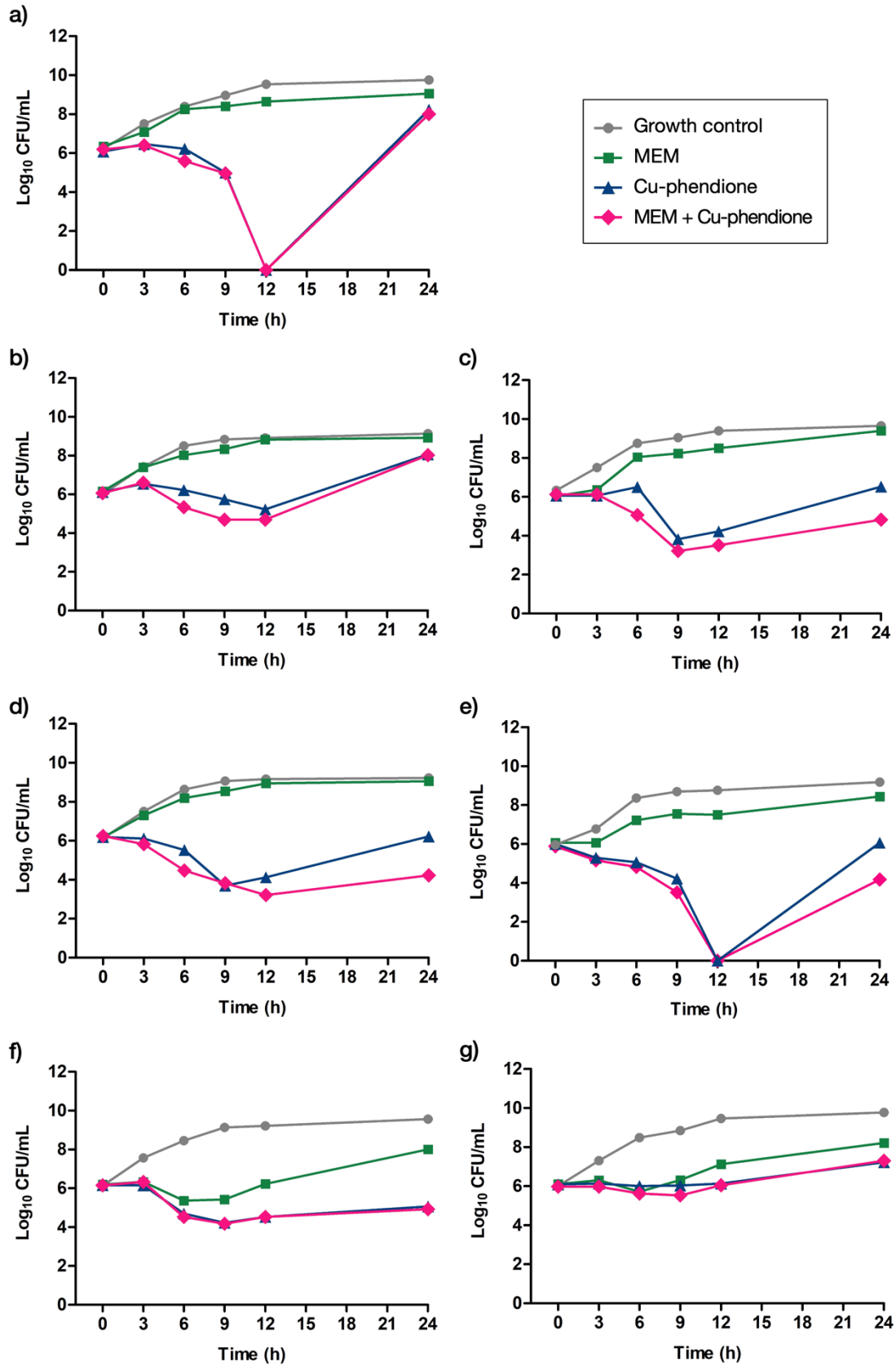
TKA were performed to confirm the activity of Ag-phendione and Cu-phendione in combination with MEM and, consistent with the checkerboard results, showed no significant synergistic effects among the tested combinations (Figs. 8 and 9). However, substantial reductions in CFU/mL were observed for the combination curves, exceeding 4 and 3 log₁₀ for MEM + Cu-phendione and MEM + Ag-phendione, respectively, compared to the growth control curves. Nevertheless, the curves for combinations and standalone phendione-based complexes exhibited similar patterns, suggesting a potential independent effect of the compounds.

In contrast, Peregrino et al. (2021) found synergistic effects for combinations of MEM and phendione-based complexes against *K. pneumoniae*. This discrepancy may be due to the differences in MIC values between the two species. The geometric mean MIC of Cu-phendione and Ag-phendione against *K. pneumoniae* is 9.88 and 10.1 μM , respectively, whereas against *A. baumannii*, the values are 1.63 and 2.48 μM . Consequently, concentrations of 0.5xMIC for *A. baumannii* are expected to be more effective due to their closer proximity to the MIC value. Additionally, corroborating the study on *K. pneumoniae* by Peregrino et al. (2021), Cu-phendione and Ag-phendione demonstrate their peak activity approximately 9 h after application.

Although not the primary focus of this assay, we observed the bactericidal action of Cu-phendione (Fig. 8) and Ag-phendione (Fig. 9) at sub-inhibitory concentrations (0.5xMIC) akin to observations in dose-response curves. The ability of these compounds to exert bactericidal effects even at sub-MIC concentrations demonstrates their potential to address bacterial infections.

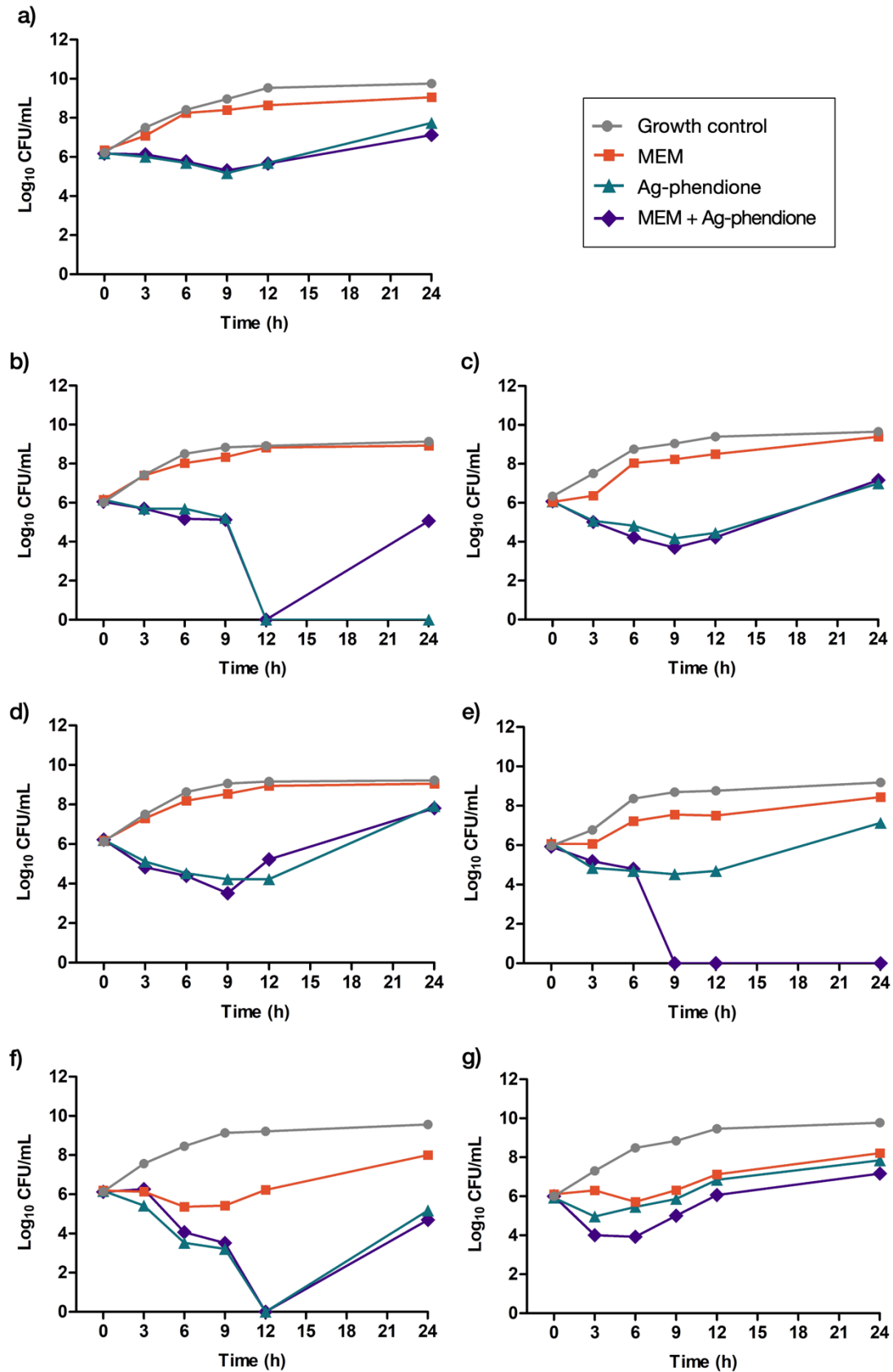
In summary, despite the lack of synergistic effects, the performance of phendione-based complexes alone suggests their promise in clinical settings. Furthermore, the significant disparities in CFU/mL concentrations between cultures treated with combinations and those treated with MEM alone endorse the capacity of these compounds to enhance the antimicrobial activity of MEM. This becomes particularly relevant in cases of carbapenem resistance, where the need for alternative and effective treatment strategies is critical.

Fig. 8 Effects of combinations of meropenem and Cu-phendione against 6 clinical strains of *A. baumannii* and the reference strain ATCC 19606



MEM – meropenem; a) – 3B; b) – 30B; c) – 38B; d) – 78B; e) – 98B; f) – 101B; g) - ATCC 19606

Fig. 9 Effects of combinations of meropenem and Ag-phendione against 6 clinical strains of *A. baumannii* and the reference strain ATCC 19606



MEM – meropenem; a) – 3B; b) – 30B; c) – 38B; d) – 78B; e) – 98B; f) – 101B; g) - ATCC 19606

3.6 Development of inducible resistance

3.6.1 Modified disk-diffusion assay

The potential occurrence of recalcitrance to Cu-phendione and Ag-phendione was assessed using the adapted TDtest. Inhibition halo diameters between 16 and 21 mm were observed for both compounds. Minimal (1 mm) or no reduction in diameter halo was noted after the second incubation (with replacement of the compound-containing disk for the glucose disk). To confirm the observed results, the test was conducted on an additional 20 strains from the previous collection (Ventura et al., 2020). Including these strains enhanced the chances of detecting antimicrobial recalcitrance, which can occur at low frequency among bacterial populations. Additionally, since the TDtest was recently established and underwent significant adaptations in our study, particularly in the preparation of disks with phendione-based complexes, validating the results with a larger number of strains was crucial. The results with the additional strains closely resembled the initial findings, with inhibition halo diameters ranging from 16 to 23 mm and minimal or no reduction in diameter by the end of the incubation period.

Regarding colony growth within the inhibition zone, no consistent pattern indicative of the tolerance phenomenon, as described by Gefen et al. (2017), was identified. However, isolated colonies were recurrently observed near the edge of confluent growth after the first 24 h of incubation, a pattern detected in at least one biological replicate for 23 strains with Cu-phendione and 15 strains with Ag-phendione. Despite removing the disk containing the phendione-based complexes and adding the glucose disk, no change in the number of colonies was observed in the subsequent 24 h, but an increase in their size was noted. As suggested by the method's original authors, the growth of colonies within the inhibition halo during the initial 24 h of the test would indicate the presence of the heteroresistance phenomenon. However, this does not seem to apply to the compounds investigated, as the MIC values for subpopulations isolated from this area were either identical to or close to the MIC of the parental strain (Table s2 – supplementary information). Given the absence of studies on the diffusion patterns of phendione-based complexes through solid-agar medium, we can speculate that possible heterogeneous diffusion might be contributing to the observed phenomenon.

Attempting to further investigate the potential for resistance development to phendione-based complexes, the reference strain ATCC 19606 was preliminarily tested using the serial passage method (data not shown). Bacterial cultures exposed to incremental concentrations of Cu-phendione and Ag-phendione were able to grow to concentrations slightly higher than the MIC. Likewise, the subsequent determination of MIC in the derivative strains provided values identical to the parental strains. These preliminary results suggest a low potential for resistance development to the studied compounds, agreeing with the findings of the TDtest. However, some technical issues, such as greater contamination risk and the need for high volumes of compound solutions, prevented this test from being carried out with additional strains.

In summary, the lack of evidence for recalcitrance and the consistency in MIC values between parental strains and strains exposed to phendione-based complexes encourages further investigation into the clinical potential of these compounds, acknowledging that additional studies are necessary to fully understand their resistance development potential and diffusion profiles.

4. Conclusions

The current study provides comprehensive insights into the efficacy of Cu-phendione and Ag-phendione against MDR and carbapenem-resistant clinical strains of *A. baumannii*. Our work has also advanced the characterization of the PD profile of these compounds and revealed the time-course of their antimicrobial activity. Both Cu-phendione and Ag-phendione demonstrate potent bactericidal effects, even at sub-MIC concentrations, and have proven effective against a broad range of bacterial densities. Their antimicrobial activity appears predominantly time-dependent, accompanied by a modest duration of PAE. Furthermore, the ability of Cu-phendione and Ag-phendione to maintain efficacy under diverse conditions, both individually and in combination with conventional antibiotics, underscores their promising therapeutic applications.

The findings presented are strengthened by the favorable characteristics demonstrated in prior studies, including antimicrobial efficacy against diverse MDR bacteria and low toxicity observed in *Galleria mellonella* and Swiss mice models. In conclusion, phendione-based complexes emerge as potential alternatives or adjuncts to current antimicrobial therapies, helping to overcome resistance mechanisms commonly found in critical pathogens. Future research should focus on investigating their pharmacokinetic properties to support advanced PK/PD studies, employing modeling and simulation approaches. Additionally, efforts should be directed towards elucidating their precise mechanisms of action to fully harness their therapeutic potential. By advancing our understanding of phendione-based complexes, we can pave the way for innovative antimicrobial therapies to combat increasingly resistant infections.