



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Medicina de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

Rafael Vecchi

**Avaliação do perfil de sensibilidade de *Klebsiella pneumoniae*
resistente aos carbapenêmicos e à polimixina B frente a
polimixina B modificada pela complexação ao íon metálico cobre**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. James Venturini

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Junior Caires

Botucatu - São Paulo

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Medicina de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

Rafael Vecchi

**Avaliação do perfil de sensibilidade de *Klebsiella pneumoniae*
resistente aos carbapenêmicos e à polimixina B frente a
polimixina B modificada pela complexação ao íon metálico cobre**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. James Venturini
Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Junior Caires

Botucatu - São Paulo
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Vecchi, Rafael.

Avaliação do perfil de sensibilidade de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e à polimixina B frente a polimixina B modificada pela complexação ao íon metálico cobre / Rafael Vecchi. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: James Venturini

Coorientador: Flávio Júnior Caires

Capes: 40101096

1. Polimixina B. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. Ions metálicos. 4. Sulfato de cobre. 5. Resistência a múltiplos medicamentos.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*; complexo com cobre; multirresistência; polimixina B.

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Decio e Maria, a quem devo tudo o que sou. Vocês são meu alicerce, meu espelho e minha inspiração. Absolutamente todas as conquistas serão sempre em seu nome, e a força para a concretização deste sonho brota da admiração que tenho por vocês.

Ao meu irmão, Vinicius, e a minha cunhada, Tamara. Agradeço imensamente o apoio e o companheirismo em todos os momentos.

Amo vocês!

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora, a quem dirigi muitas preces ao longo desta caminhada, suplicando luz para os momentos difíceis e sabedoria para aqueles de êxito. É Neles em quem sempre coloco minha esperança e, com certeza, a fé não decepciona.

De maneira especial ao meu orientador, Prof. Dr. James Venturini, pela confiança em mim depositada, aceitando este desafio sem questionar qualquer de minhas iniciativas ou decisões. Agradeço por me incluir em sua equipe de pesquisa, sendo para mim motivo de imenso orgulho ser parte integrante dela.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Flávio Junior Caires, por apontar direções nos momentos em que parecia estar sem rumo. Agradeço a confiança, a disponibilidade e a dedicação.

De modo todo especial a Ms. Aniele de Moura, dos laboratórios de Química da Unesp – Câmpus Bauru, e ao Dr. Carlos Henrique Camargo, do Núcleo de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, grandes parceiros no desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço infinitamente o empenho e dedicação, na certeza de que, sem vocês, este projeto não teria passado de uma ideia, sem sair do papel. A vocês, minha eterna gratidão!

Ao Hospital Estadual Bauru, especialmente a Rosilene Aparecida Floriano Cordeiro e Regiane Daniela Alves Montier, do Núcleo de Ensino e Pesquisa, a Andrea Raquel Parolin, supervisora da Farmácia Hospitalar, e a Fabiana Castro Pegoraro,

supervisora do Laboratório de Análises Clínicas, pela parceria e suporte, tornando este projeto possível.

Aos amigos do Laboratório de Análises Clínicas, em especial àqueles do setor de Microbiologia, pelo companheirismo e amizade sinceros, além de todos os momentos em que estivemos juntos, especialmente nas risadas (que não foram poucas!).

Aos meus amigos Mônica da Silveira e Adriano de Souza Pessoa, que também têm participação importante ao longo da idealização e desenvolvimento deste projeto. Obrigado pelo carinho, prontidão, paciência e por estarem presentes em todos os momentos, os de angústia e os de celebração.

Quero também deixar o meu mais sincero muito obrigado a todos aqueles que, de maneira indireta, contribuíram para a concretização deste sonho. Ao longo destes 2 anos tive o imenso prazer de conhecer e conviver com pessoas maravilhosas, desde docentes até os amigos conquistados (e não apenas colegas de disciplinas!). Pessoas que acreditaram em mim, no meu trabalho, e que, com toda certeza, tornaram esta caminhada muito mais prazerosa e feliz!

Muito obrigado!

Epígrafe

EPÍGRAFE

Espera no Senhor

Espera no Senhor

Mesmo quando a vida pedir de ti mais do que podes dar

E o cansaço já fizer teu passo vacilar

Espera no Senhor

Mesmo se a solidão teu peito machucar

E te der vontade de ir embora e tudo abandonar

Espera no Senhor

Há um Deus que te ama e Ele tudo pode transformar

Seu amor te sustentará

Espera Nele, e Ele tudo fará!

Espera no Senhor

Mesmo se o coração angustiado está

Por ver alguém que amas longe do Senhor andar

Espera no Senhor

Mesmo que suas promessas demorem a se cumprir

E a vontade Dele seja sacrifício para ti

Espera no Senhor

Há um Deus que te ama e Ele tudo pode transformar

Seu amor te sustentará

Espera Nele, e Ele tudo fará!

Elíana Ribeiro

Sumário

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	15
Lista de figuras	18
Lista de tabelas	21
Resumo	23
Palavras-chave	23
Abstract.....	25
Keywords	25
1. Introdução	27
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	27
1.2. Resistência aos carbapenêmicos.....	29
1.3. Polimixinas	30
1.4. Resistência às polimixinas	33
1.5. Complexação de metais à polimixina B.....	37
1.6. Justificativa.....	39
Referências da Introdução	41
2. Objetivos	51
2.1 Objetivo Geral	51
2.2 Objetivos Específicos	51
3. Manuscrito	52
Title Page.....	53
Abstract.....	54
1. Introduction	55
2. Materials and Methods.....	56
2.1. Selection of specimens	56
2.2. Synthesis of copper (II) complex.....	56
2.3. Characterization of copper (II) complex	57
2.4. Broth microdilution for copper sulfate, polymyxin B and copper (II) complex	58
2.5. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)	59
3. Results and Discussion	59
4. Conclusion	70
Author Statement	72
References.....	73

4. Conclusões	79
Apêndice	80
Anexo 01	81
Anexo 02	83
Anexo 03	85

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

- Δm = variação de massa
- ΔT = variação de temperatura
- $\theta^{\circ}\text{C}$ = intervalos de temperatura
- $\mu\text{g/mL}$ = microgramas/mililitros
- **ATCC** = *American Type Culture Collection*
- **BGN** = Bacilo Gram Negativo
- **BHI** = caldo infusão de cérebro e coração
- **BrCAST** = *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- **CAMH** = caldo Müller-Hinton cátion ajustado
- **CLSI** = *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- **CPE** = enterobactéria produtora de carbapenemase
- **CPRKp** = *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e a polimixina B
- **[Cu3pb]** = complexo polimixina B – cobre
- **Dab** = $\text{L-}\alpha,\gamma$ - ácido diaminobutírico
- **DMSO** = dimetilsulfóxido
- **DTA** = análise térmica diferencial
- **ESBL** = β -lactamase de espectro estendido
- **EUCAST** = *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- **HEB** = Hospital Estadual Bauru
- **IV** = infravermelho
- **KPC** = *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
- **L-Ara4N** = 4-amino-4-deoxi-L-arabinose
- **LPS** = lipopolissacarídeos
- **MBL** = metalo- β -lactamase
- **MDR** = multidroga-resistente

- **MIC** = concentração inibitória mínima
- **MIR** = *Mid-Infrared Spectroscopy*
- **NDM** = *New Delhi* metalo- β -lactamase
- **PBS** = tampão fosfato salino
- **PCR** = reação em cadeia da polimerase
- **PDR** = pandroga-resistente
- **PEtN** = fosfoetanolamina
- **PFGE** = *pulsed-field gel electrophoresis*
- **PPG** = propilenoglicol
- **TCS** = *Two Component Systems*
- **TG** = termogravimetria
- **T_p** = temperatura do pico
- **TRL-4** = receptores *toll-like* 4
- **TSB** = caldo triptona soja
- **TTC** = 2,3,5-trifeniltetrazólio
- **UFC/mL** = unidade formadora de colônia/mililitro
- **UTI's** = unidades de cuidado intensivo
- **UV** = ultravioleta
- **XDR** = extensivamente droga-resistente

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Representação esquemática da parede celular bacteriana de bactérias Gram-negativas.....**29**

Figura 2. Estrutura da polimixina B.....**33**

Figura 3. Representação esquemática da ativação dos genes envolvidos com a modificação do LPS relacionados a resistência à polimixinas em BGN.....**35**

MANUSCRITO

Figure 1. TG/DTG-DTA curves of the polymyxin B ligand in dry air atmosphere**60**

Figure 2. TG/DTG-DTA curves of the polymyxin B ligand in N₂ atmosphere**61**

Figure 3. TG/DTG-DTA curves of the copper (II) complex in dry air atmosphere**63**

Figure 4. Theoretical (a) and calcined (b) copper (II) oxide diffractogram by complexometry**64**

Figure 5. MIR spectrum of the polymyxin B (a) and copper (II) complex (b)**66**

Figure 6. Diffractogram of polymyxin b (a) and copper (II) complex (b) according to the XRPD67

Figure 7. Biological activity determination of copper sulfate, polymyxin B and $[\text{Cu}_3\text{pb}]$ complex by broth microdilution technique ($\mu\text{g mL}^{-1}$) against 18 isolates of CPRKp (tested in duplicate)68

Figure 8. Dendrogram showing the clonality of the 18 isolates tested against the copper (II) complex69

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1. Temperature ranges ($\theta^{\circ}\text{C}$), mass loss (Δm) and peak temperature (T_P) observed at each step in TG/DTG-DTA curves of the ligand (polymyxin B) and the copper (II) complex in dry air atmosphere**63**

APÊNDICE

Tabela 1. Valores médios de MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para os 18 isolados de CPRKp testados frente a polimixina B (em duplicata).....**81**

Tabela 2. Valores médios de MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para os 18 isolados de CPRKp testados frente ao complexo Cu_3pb (em duplicata).....**83**

Tabela 3. Valores médios de MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para os 18 isolados de CPRKp testados frente ao sulfato de cobre (em duplicata).....**85**

Resumo

RESUMO

Devido ao crescente isolamento de espécimes de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a praticamente todas as classes de drogas antimicrobianas, a busca por novas drogas que sejam alternativa terapêutica para o tratamento das infecções por eles causadas se torna relevante. Nesse contexto, a complexação de íons metálicos a drogas antimicrobianas é uma das abordagens empregadas, uma vez que é possível gerar novas drogas com atividade superior as drogas já existentes. No presente estudo, foi realizada a síntese de metalofármaco por reação de coordenação entre sulfato de polimixina B e cobre (II). O produto desta reação foi caracterizado e sua atividade antimicrobiana frente a espécimes de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e à polimixina B foi avaliada. Os resultados demonstraram que as concentrações inibitórias mínimas (MIC) do complexo sintetizado foram menores em relação aos MICs de polimixina B para 44,44% dos espécimes avaliados; para 33,33% dos espécimes os MIC's foram equivalentes, e para 22,23% dos espécimes os MIC's do complexo foram superiores aos MIC's da polimixina B. Esses resultados são promissores, uma vez que houve um incremento na atividade bacteriana da polimixina complexada ao metal para quase metade dos espécimes avaliados, mostrando que a síntese de novas drogas antimicrobianas através da complexação de íons metálicos é uma técnica que deve ser mais explorada. Além disso, nossos resultados devem conduzir a novos estudos que visem a melhor compreensão da estrutura, mecanismos de ação, toxicidade e atividade biológica, para determinar se o complexo gerado pode, de fato, ser uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por tais microrganismos multidroga-resistentes.

PALAVRAS-CHAVE: polimixina B, complexo com cobre, *Klebsiella pneumoniae*, multirresistência

Abstract

ABSTRACT

Due to the increasing isolation of *Klebsiella pneumoniae* specimens resistant to virtually all classes of antimicrobial drugs, the research for new drugs that are alternative therapeutics for the treatment of infections caused by them becomes relevant. In this context, the complexation of metal ions to antimicrobial drugs is one of the approaches used, since it is possible to generate new drugs with higher activity than existing drugs. In the present study, metallodrugs synthesis was performed by a coordination reaction between polymyxin B sulfate and copper (II). The product of this reaction was characterized and its antimicrobial activity against specimens of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems and polymyxin B was evaluated. The results showed that the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the synthesized complex were lower than the polymyxin B MICs for 44.44% of the evaluated specimens; for 33.33% of the specimens the MICs were equivalent, and for 22.23% of the specimens the MICs of the complex were superior to the MICs of polymyxin B. These results are encouraging, since there was an increase in the bacterial activity of metal complexed polymyxin for almost half of the evaluated specimens, showing that the synthesis of new antimicrobial drugs through the complexation of metallic ions is a technique that should be further explored. In addition, our results should lead to further studies aiming to a better understanding of the structure, mechanisms of action, toxicity and biological activity to determine if the complex generated may indeed be a therapeutic alternative for the treatment of infections caused by such multidrug-resistant microorganisms.

KEYWORDS: polymyxin B, copper complex, *Klebsiella pneumoniae*, multidrug-resistance

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O isolamento de bactérias resistentes a um vasto repertório de agentes antimicrobianos devido a expressão de diversos mecanismos de resistência tem crescido exponencialmente nos últimos anos. A espécie *Klebsiella pneumoniae* é um patógeno prevalente no ambiente hospitalar e está associada à infecções relacionadas a elevadas taxas de morbidade e mortalidade.¹ Recentemente, cepas de *K. pneumoniae* resistentes a praticamente todas as classes de drogas têm sido isoladas no Brasil e em todo o mundo.² Assim, a compreensão dos mecanismos pelos quais esta bactéria desenvolve a resistência as mais diversas classes de antimicrobianos, de modo a evitar sua disseminação, bem como propor alternativas terapêuticas é uma necessidade constante, de modo que a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos com atividades antimicrobianas tem se destacado entre as soluções propostas para este problema.

1.1. *Klebsiella pneumoniae*

A família Enterobacteriaceae é um grupo heterogêneo de microrganismos composto por importantes gêneros e espécies amplamente encontrados no solo, nas plantas, na água e compondo a microbiota intestinal de humanos e animais. Além disso, são os microrganismos mais comumente associados à infecções humanas.³ De modo particular, a espécie *Klebsiella pneumoniae* destaca-se como um patógeno associado a infecções de diversos sítios, seja de origem comunitária ou hospitalar.^{1,4,5}

Assim como outras espécies pertencentes a família Enterobacteriaceae, a bactéria *K. pneumoniae* possui necessidades nutricionais simples, fermenta a glicose e outros açúcares, geralmente, com produção de gás, reduz o nitrato a nitrito, é catalase-positiva e oxidase-negativa, não forma esporos e, por ser aeróbia facultativa, cresce rapidamente em diversos meios de cultura.³

K. pneumoniae é classificada como um microrganismo Gram-negativo, uma vez que possui uma membrana externa intimamente ligada à parede celular, cujas principais funções estão relacionadas com a manutenção da estrutura bacteriana e

com a permeabilidade a moléculas de alto peso molecular e moléculas hidrofóbicas.³ Esta membrana é dividida em duas camadas: a monocamada interna, que se relaciona intimamente com a parede celular, composta por fosfolipídeos, e a monocamada externa, onde é encontrado o lipopolissacarídeo (LPS). A membrana externa se mantém estável através de ligações de cátions divalentes, como magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}), entre os grupos fosfato do LPS, bem como por interações hidrofóbicas entre o LPS e proteínas.⁶

O LPS é composto por três regiões: um lipídio A, em sua extremidade mais interna, um core de oligossacarídeo em sua porção central, e um antígeno O em sua extremidade mais externa.³ O lipídio A é composto por um esqueleto dissacarídico glicosaminafosforilado ligado a ácidos graxos, o que torna a estrutura carregada negativamente, e ancora o LPS à superfície da monocamada interna. O lipídio A é a endotoxina bacteriana e promove a ativação dos receptores *toll-like* 4 (TRL4), desencadeando resposta inflamatória exacerbada.⁶ O core de oligossacarídeo é uma pequena porção central do LPS que, assim como o lipídio A, tem sua estrutura altamente conservada e desempenha papel fundamental nas funções de barreira da membrana externa bacteriana.⁶ A porção antígeno O é a mais externa do LPS e atua na fuga do ataque do sistema imunológico do hospedeiro. Dessa forma, essa porção é menos conservada do que o lipídio A e o core do oligossacarídeo e define as propriedades da superfície celular em espécies que não produzem cápsula, uma vez que microrganismos que produzem cápsula podem não apresentar o core de oligossacarídeo em seu LPS ou este não estar aparente na superfície celular.⁶

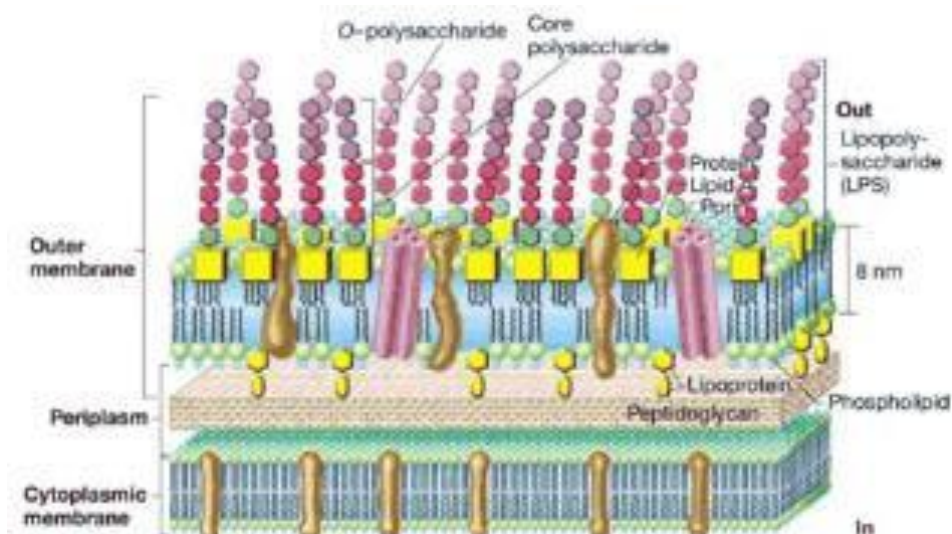


Figura 1. Representação esquemática da parede celular bacteriana de bactérias Gram-negativas.⁷

1.2. Resistência aos carbapenêmicos

A produção e disseminação das enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e de β -lactamases do tipo AmpC foram os principais mecanismos de resistência apresentados pelas várias espécies da família Enterobacteriaceae relacionados com a resistência aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos até a metade dos anos 1990.⁸ Com isso, o uso de cefalosporinas de amplo espectro para o tratamento empírico de infecções causadas por essas bactérias em pacientes hospitalizados ficou comprometido e o uso de outras drogas tornou-se necessário, entre elas, os carbapenêmicos.⁹ O aumento na utilização dos carbapenêmicos como alternativa terapêutica resultou no surgimento de cepas resistentes a estas drogas nos últimos anos.^{8,9} Os membros da família Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos tornaram-se responsáveis por surtos em unidades de saúde em várias partes do mundo, de modo que, em algumas localidades, têm se tornado endêmicos.^{10,11}

Embora estáveis à maioria das β -lactamases produzidas pelas bactérias da família Enterobacteriaceae, os relatos de cepas resistentes aos carbapenêmicos têm aumentado significativamente nos últimos anos.¹² A resistência aos carbapenêmicos pode ocorrer devido a combinação de vários mecanismos, como modificações na permeabilidade da membrana externa associada à hiperprodução de β -lactamases do tipo AmpC ou ESBL e/ou pela superexpressão de bombas de efluxo, ou ainda pela

produção de β -lactamases específicas, que degradam os carbapenêmicos, as carbapenemases.^{8,12,13}

As enzimas carbapenemases representam a família mais versátil das β -lactamases, possuindo amplo espectro de atividade, que compreende quase todos os antimicrobianos β -lactâmicos^{13,14} e são classificadas de acordo com seus requerimentos funcionais, bem como pela estrutura de seu sítio ativo^{9,12,15}, podendo ser divididas em serino- β -lactamases, pertencentes as classes A e D de Ambler, como as enzimas *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)^{5,12-14,17-20} e a oxacilinase OXA-48^{5,15,21-25}, respectivamente, e em metalo- β -lactamases (MBLs) pertencentes a classe B de Ambler, exemplificadas pela enzima *New Delhi* metalo- β -lactamase (NDM).^{5,26-29}

Os genes que codificam as enzimas carbapenemases são, geralmente, carregados por elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos e transposons, podendo abrigar genes responsáveis por conferir resistência a outras classes de antimicrobianos. Esses elementos são transferíveis e podem ser adquiridos facilmente por microrganismos de outros gêneros, conferindo a eles o perfil de multidroga-resistência.^{10,16} As infecções causadas por membros da família Enterobacteriaceae produtores de carbapenemase (CPE), comumente resistentes a maioria das classes de antimicrobianos disponíveis, têm se tornado cada vez mais comuns e de difícil tratamento, sendo consideradas preditores independentes de mortalidade.^{11,30,31}

1.3. Polimixinas

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos catiônicos cíclicos descobertos em 1947 como produtos do metabolismo do microrganismo de solo *Paenibacillus (Bacillus) polymyxa*.^{32,33} Esta classe de antibióticos é composta por um grupo de cinco polimixinas quimicamente diferentes: A, B, C, D e E, esta última também chamada de colistina, uma vez que é derivada do *Bacillus polymyxa* subespecie *colistinus*.^{32,33} Entretanto, apenas a polimixina B e a colistina têm sido utilizadas na prática clínica devido a elevada toxicidade das demais.³²⁻³⁴

Esses antimicrobianos foram disponibilizados para uso terapêutico, inicialmente, na década de 50, porém, devido ao surgimento de novas drogas com

espectro de ação similar ou maior e relatos de alta neurotoxicidade e nefrotoxicidade, as polimixinas foram gradualmente retiradas da prática clínica a partir dos anos 1970, quando eram utilizadas apenas para tratar pacientes com fibrose cística pulmonar que sofriam com infecções pulmonares de repetição por bactérias multidroga-resistentes (MDR) e em soluções tópicas ou inalatórias no tratamento de infecções não graves.^{32,33,35}

Estruturalmente, as polimixinas consistem de uma cadeia lateral tripeptídica com um ácido graxo na porção terminal ligada a um anel peptídico policatiônico.^{32,36,37} A polimixina B é definida pela presença de um resíduo do aminoácido *D*-fenilalanina na posição 6; todos os resíduos de aminoácidos estão na *L*-configuração, exceto por esta *D*-fenilalanina na posição 6. O produto comercial da polimixina B para uso parenteral está disponível sob a forma de sulfato de polimixina B e é composto por uma mistura de vários componentes, sendo a polimixina B1 e a polimixina B2 os componentes majoritários. Estes componentes diferem entre si pela cadeia do ácido graxo que o compõe, sendo que para a polimixina B1 esta é o ácido 6-metil-octanóico e para a polimixina B2, o ácido 6-metil-heptanóico.³⁷

Uma vez que são antimicrobianos anfipáticos, as polimixinas atuam como detergentes catiônicos ao perturbar a membrana citoplasmática bacteriana, causando extravasamento dos componentes citoplasmáticos e consequente morte celular através da interação com a fração lipídio A das moléculas de LPS.^{37,38} A associação inicial das polimixinas com a membrana bacteriana ocorre através de interações eletrostáticas entre a droga, carregada positivamente, e a fração lipídio A das moléculas de LPS, carregadas negativamente, levando a um desarranjo na membrana celular; além disso, também ocorre o deslocamento das pontes formadas por cátions divalentes (Mg^{2+} e Ca^{2+}) que normalmente atuam estabilizando as moléculas de LPS. As cadeias laterais de ácidos graxos também interagem com o LPS, contribuindo para a complexação entre as polimixinas e a membrana externa. Como resultado deste processo, ocorre um aumento na permeabilidade da membrana bacteriana, induzindo sua ruptura, com extravasamento dos componentes citoplasmáticos e, subsequentemente, morte celular.^{32,36,37} Além da atividade antibacteriana direta, as polimixinas também possuem potente atividade anti-endotoxina; a endotoxina das bactérias Gram-negativas é a fração lipídio A das moléculas de LPS, as quais são neutralizadas pela ação das polimixinas.^{32,36}

As polimixinas possuem excelente atividade bactericida contra várias espécies de bacilos Gram-negativos (BGN), incluindo enterobactérias e espécies não-fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.; entretanto, algumas espécies de BGN como *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Serratia* spp. e *Burkholderia* spp. apresentam resistência intrínseca à essas drogas.^{34,36} Estudos recentes do SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*) apontam que as polimixinas ainda possuem atividade contra BGN, mesmo aqueles isolados que apresentam resistência aos carbapenêmicos.^{38,39} Também é válido ressaltar que as polimixinas não apresentam atividade contra espécies de cocos Gram-positivos e Gram-negativos, bacilos Gram-positivos, anaeróbios e fungos.³²

A avaliação do perfil de susceptibilidade *in vitro* para a polimixina B deve ser realizada através do método de microdiluição em caldo, com a determinação da concentração inibitória mínima (MIC).⁴⁰ O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) não possui pontos de corte com valores da MIC estabelecidos de polimixina B para enterobactérias, embora a recomendação seja que enterobactérias com MIC menor ou igual a 2 µg/mL sejam consideradas sensíveis, e com MIC maior que 4 µg/mL, resistentes.^{40,41} Já o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) disponibiliza pontos de corte com valores da MIC estabelecidos para polimixina B frente as enterobactérias, e preconiza que cepas que apresentem MIC menor ou igual a 2 µg/mL sejam consideradas sensíveis, e com MIC superior a 2 µg/mL, resistentes.⁴²

A disseminação de isolados de *Acinetobacter* spp. produtores de OXA-23, de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos e de espécies da família Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases têm levado ao aumento do uso das polimixinas, ao passo que essas drogas são, muitas vezes, a última alternativa terapêutica de tratamento para as infecções causadas por esses microrganismos.^{36,38} Entretanto, a reutilização das polimixinas está associada a um possível novo problema terapêutico relevante, o advento de bactérias resistentes a (quase) todas as classes de agentes antimicrobianos disponíveis, inclusive as polimixinas, caracterizando as bactérias extensivamente droga-resistentes (XDR) e pandroga-resistentes (PDR).⁴³

citoplasmática através de uma reação de transfosforilação. A segunda proteína, então, promove a ativação ou a repressão dos genes-alvo, desencadeando a resistência às polimixinas.⁴⁹

Estudos têm mostrado que os TCS PhoPQ e PmrAB estão envolvidos com o desenvolvimento da resistência às polimixinas em *K. pneumoniae*; estes TCS estão relacionados com a adição de L-Ara4N e/ou PEtN à fração lipídio A do LPS bacteriano. O TCS PhoPQ é ativado em situações de baixas concentrações de Mg^{2+} e pH ácido (pH 5,5) ou na presença de peptídeos catiônicos. O sensor histidina-quinase PhoQ, uma proteína integral de membrana cujo domínio periplasmático está envolvido na detecção de sinais, quando ativado, ativa a proteína PhoP por fosforilação. Então, o PhoP ativa o operon *arnBCADTEF* direta ou indiretamente.^{45,48,51}

Outra via de modificação do LPS bacteriano se deve a ativação constitutiva do TCS PmrAB, que pode ser desencadeada por mutações nos genes *pmrA* ou *pmrB*, ou ainda devido a concentrações elevadas de ferro (Fe^{3+}) e pH ácido (pH 5,5). Sob estas condições, o sensor histidina-quinase ligado a membrana PmrB ativa a proteína reguladora PmrA, a qual promove o *up-regulation* do operon *arnBCADTEF*.^{45,51,52}

O operon *arnBCADTEF* (também chamado de *pmrF*, *pgb* ou operon *pmrHFIJKLM*), uma vez ativado, codifica enzimas responsáveis pela síntese e transferência de L-Ara4N ou PEtN à fração lipídio A do LPS bacteriano que, por sua vez, torna-se menos carregado negativamente, diminuindo sua afinidade às polimixinas, resultando na resistência bacteriana. A adição de L-Ara4N requer os produtos do gene *pmrE* e do operon *arnBCADTEF*, enquanto que a adição de PEtN é codificada pelo gene *pmrC*.^{45,51}

Recentemente, estudos revelaram que a inativação do gene *mgrB*, que codifica uma pequena proteína transmembrana que exerce *feedback* negativo no sistema regulatório PhoPQ, também está envolvido em modificações no LPS bacteriano que levam à resistência às polimixinas. Tem sido proposto que a proteína MgrB realiza este *feedback* por inibição da atividade quinase do sistema PhoPQ e/ou estimulando a atividade fosfatase, o que subsequentemente suprime a fosforilação deste sistema, levando a repressão dos genes regulados pelo sistema PhoPQ. Assim, a perturbação do gene *mgrB* em *K. pneumoniae* tem sido identificada como tendo um papel proeminente na resistência às polimixinas nesta bactéria, uma vez que pode

KpnEF, presentes em cepas selvagens de *K. pneumoniae*, lançam as polimixinas para fora da célula bacteriana, em um processo dependente de energia.⁴⁸

Recentemente, pesquisadores têm demonstrado que não são apenas mutações cromossômicas que estão relacionadas ao desenvolvimento de resistência às polimixinas por BGN, mas que esta resistência também pode ser mediada por plasmídeos. Liu e colaboradores⁵⁴ relataram a identificação do gene *mcr-1* em cepas de *Escherichia coli* isoladas de porcos, em 2015, na China. A proteína codificada pelo gene *mcr-1* é um membro da família de enzimas da classe fosfoetanolaminatransferases, cuja expressão resulta na adição de PETN à fração lipídio A do LPS bacteriano.⁵⁴ Em outro estudo, Quan e colaboradores demonstraram a presença do gene *mcr-1* em isolados clínicos de *E. coli* e *K. pneumoniae* oriundos de pacientes com infecção da corrente sanguínea em vários hospitais na China; este estudo conclui que infecções da corrente sanguínea causadas por isolados positivos para o gene *mcr-1* são raras, esporádicas, e com resistência exclusiva às polimixinas na ausência de outros mecanismos de resistência associados. Além disso, discute-se que a frequência de isolamento do gene *mcr-1* é maior em cepas de *E. coli* do que em cepas de *K. pneumoniae*.⁵⁵

Overejo e colaboradores⁵⁶ demonstraram que o gene *mcr-1* também está presente no meio ambiente. Os pesquisadores relataram o isolamento de cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* carreadoras do gene *mcr-1* em água de esgoto proveniente de duas estações de tratamento de água diferentes na região de Barcelona, Espanha. Este estudo revela a preocupação com a presença do gene *mcr-1* no meio ambiente, assim como sugere alta prevalência desse gene na comunidade.⁵⁶

Após sua identificação inicial, o gene *mcr-1* foi encontrado em mais de 30 países através dos cinco continentes. Entretanto, pesquisadores identificaram um novo gene que confere resistência às polimixinas mediada por plasmídeos em cepas de *E. coli* isoladas de suínos e bovinos que não carregavam o gene *mcr-1*, na Bélgica. Este novo gene, chamado de *mcr-2*, também faz parte da família de enzimas da classe das fosfoetanolaminatransferases e guardam 76,7% de similaridade de nucleotídeos com o gene *mcr-1*.⁵⁷

Apesar da prevalência dos genes *mcr-1/mcr-2* ser bastante baixa entre humanos – menor que 1%, segundo estudos previamente realizados – sugerindo que

sua disseminação através de alimentos, animais e do meio ambiente para humanos é mais baixa do que se imaginava inicialmente, existe grande preocupação com a possível disseminação silenciosa destes genes, sobretudo em cepas já resistentes a outras classes de antimicrobianos, notadamente aquelas pertencentes a família Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemase.^{16,47,58-60} Tendo isto em vista, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) emitiu, em 2016, o comunicado nº 01/2016, que trata da importância e necessidade da detecção destes genes em isolados clínicos no Brasil.⁶¹ O primeiro relato de detecção do gene *mcr-1* em isolado clínico no Brasil ocorreu em 2016, no Rio Grande do Norte.⁶²

É válido ressaltar, ainda, que a pressão seletiva gerada pelo uso crescente das polimixinas tem papel importante na seleção de cepas mutantes resistentes, que têm a capacidade de persistir e rapidamente se disseminar no ambiente hospitalar.^{47,63} Além disso, existem mecanismos de resistência às polimixinas ainda desconhecidos, para os quais estudos tem sido dirigidos, com o objetivo de compreender, ainda mais profundamente, a resistência à elas.^{64,65}

1.5. Complexação de metais à polimixina B

Devido a rápida evolução da resistência aos antimicrobianos e ao isolamento de BGN MDR e XDR em amostras clínicas, se faz necessária a busca por alternativas que visem contornar os diversos mecanismos de resistência.⁶⁶ Para isso, várias abordagens têm sido empregadas, entre elas, o desenvolvimento de novos antimicrobianos a partir da compreensão da relação estrutura-atividade das drogas já disponíveis para uso clínico, possibilitando sua modificação estrutural como alternativa para o desenvolvimento de novas drogas.⁶⁶

Seguindo este princípio, Velkov e colaboradores⁶⁷ demonstraram a síntese de novas estruturas lipopeptídicas similares à polimixina B através de modificações hidrofóbicas nas posições R6 ou R7 das moléculas de polimixina B, além de modificações nas cadeias laterais de ácidos graxos. Como resultado, este estudo gerou lipopeptídeos com atividade antimicrobiana muito promissora contra cepas de BGN resistentes às polimixinas, inclusive resultando em atividades *in vitro* melhores do que as drogas comercialmente disponíveis.⁶⁷

Outra abordagem empregada é a complexação de antimicrobianos a íons metálicos, com o objetivo de gerar novos fármacos com atividade antimicrobiana superior aos medicamentos comercialmente disponíveis. O interesse pela atividade exercida por íons metálicos associados a medicamentos teve início a partir do ano de 1965, quando Rosenberg e colaboradores demonstraram a atividade antitumoral do complexo denominado cisplatina, um medicamento a base do metal platina que, ainda nos dias atuais, é amplamente empregado no tratamento de câncer de ovário e testículo, refletindo em altos índices de cura. Como consequência, atualmente vários compostos inorgânicos têm sido empregados na prática clínica, dentre os quais os complexos de ouro, utilizados no tratamento da artrite reumatoide; o nitroprussiato de sódio, um complexo de ferro (III) eficaz no tratamento da hipertensão; o carbonato de lítio, utilizado no tratamento do transtorno bipolar; a sulfadiazina de prata, um antimicrobiano tópico utilizado para prevenção e tratamento de infecções de pele, sobretudo em pacientes queimados.⁶⁸

Estudos envolvendo a complexação de metais de transição a antimicrobianos, como a bacitracina, as sulfonamidas e as fluoroquinolonas, têm sido realizados; os resultados obtidos têm mostrado atividade antimicrobiana *in vitro* superior das drogas associadas à metais em relação às drogas livres.⁶⁸⁻⁷²

A complexação de moléculas que por si mesmas apresentam atividade antimicrobiana a íons metálicos é uma importante estratégia empregada com o intuito de aumentar sua eficácia, sobretudo frente a cepas resistentes.^{66,72} Segundo relatos da literatura, aspectos como a natureza do ligante e sua capacidade em formar quelatos com o metal empregado, favorecem a atividade antimicrobiana dos complexos antimicrobiano-metal. Entretanto, a interação entre um íon metálico e um ligante resulta na obtenção de complexos com ampla variedade de números de coordenação, estados de oxidação e geometrias; além disso, as características intrínsecas ao íon metálico, adicionadas aos aspectos cinéticos e termodinâmicos do composto obtido, conduzem a estruturas moleculares que possuem amplo espectro de reatividade. É importante observar que alguns complexos podem não ser mais ativos que as drogas livres devido à baixa solubilidade, instabilidade, diminuição do caráter lipofílico do complexo obtido ou fatores relacionados ao mecanismo de ação, de modo que a introdução de um íon metálico pode inativar ou diminuir a atividade do fármaco ao invés de potencializar sua atividade.⁷²

A molécula de polimixina B é dividida em cinco regiões estruturais: (i) a cadeia lateral de ácido graxo hidrofóbica com o *N*-terminal; (ii) os nove resíduos do α,γ -ácido diaminobutírico (Dab); (iii) o segmento linear tripeptídico; (iv) a região hidrofóbica nas posições R6 e R7 no anel heptapeptídico cíclico; (v) e a espinha dorsal heptapeptídica.^{67,73} Dessa forma, pode-se inferir que a polimixina B possui vários sítios para a ligação de íons metálicos, uma vez que possui muitos grupos doadores de elétrons tanto na cadeia lateral quanto na estrutura cíclica principal, incluindo grupos amino *N*-terminais que, após a desprotonação, atuam ancorando o íon metálico.⁷⁴

Dada a escassez de agentes antimicrobianos alternativos para o tratamento de infecções causadas por microrganismos MDR e XDR, está claro que as polimixinas terão papel central nesta área por muitos anos. Estudos vem sendo feitos com o objetivo de produzir uma nova geração de polimixinas, que tenham papel de destaque na melhora da terapêutica; compostos com toxicidade reduzida e atividade direta limitada, mas que potencializam a atividade de outras drogas, além de drogas com atividade direta superior, que poderiam ser introduzidas no combate a infecções causadas por cepas resistentes às polimixinas, estão sendo testadas.⁷⁵

Para este estudo, o íon cobre (II) foi selecionado para a reação com o sal sulfato de polimixina B devido a disponibilidade, custo e por se tratar de um metal que apresenta propriedades antimicrobianas inerentes.⁶⁶

1.6. Justificativa

O crescente impacto da resistência antimicrobiana é uma preocupação global. O Brasil apresenta, de modo geral, níveis elevados de resistência bacteriana entre os seus principais agentes patogênicos, particularmente entre os BGN.

Os isolados de *K. pneumoniae* apresentam a capacidade de adquirir e expressar diversos mecanismos de resistência contra vários agentes antimicrobianos, o que tem se tornado uma realidade assustadora em muitos hospitais de todo o mundo. Vários estudos têm mostrado que o isolamento de espécimes de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e à polimixina B está associado a

elevadas taxas de mortalidade, sendo, inclusive, preditores independentes de mortalidade.⁷⁶⁻⁷⁹

Desta forma, a pesquisa e o desenvolvimento de novas drogas com propriedades antimicrobianas se mostra cada vez mais importante, haja visto a falta de opções terapêuticas para o tratamento destas infecções. Neste contexto, os metalofármacos, drogas as quais foram inseridos átomos de metais através de reações de coordenação, ganham extrema relevância.

A síntese e caracterização de metalofármacos tendo como base a molécula da polimixina B, a qual foi complexado o íon Cu^{2+} , nos permitiu demonstrar a atividade bactericida do complexo formado frente a espécimes de *K. pneumoniae* previamente caracterizados como resistentes aos carbapenêmicos e à polimixina B disponível comercialmente.

Referências da Introdução

1. Ah YM, Kim AJ, Lu JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Int J Antimicrob Agents. 2014; 44(1):8-15.
2. Martins WMBS, Cordeiro-Moura JR, Ramos AC, Fehlberg LC, Nicoletti AG, Gales AC. Comparison of phenotypic test for detecting BKC-1-producing Enterobacteriaceae isolates. Diag Microbiol Infect Dis. 2016; 84:246-248.
3. Murray PR. Microbiologia Médica. 7 ed. Editora Elsevier: 2014.
4. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(4):589-603.
5. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2011; 17(10):1791-1798.
6. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Bio Rev. 2003; 67(4):593-656.
7. Madingan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley D, Stahl D. Brock Biology of Microorganisms. 10 ed. Editora Pearson: 2003.
8. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. N Engl J Med. 2005; 352(4):380-391.
9. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activity of tigecycline and other broad spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemases- and metallo- β -lactamases-producing Enterobacteriaceae: Report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(2):570-573.
10. Nicoletti AG, Marcondes MFM, Martins WMBS, Almeida LGP, Nicolás MF, Vasconcelos ATR, et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(9):5159-5163.

11. Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20(7):1170-1175.
12. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009; 9:228-236.
13. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(3):440-458.
14. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis.* 2011; 53(1):60-67.
15. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* 2007; 2(5):501-512.
16. He QW, Xu XH, Lan FJ, Zhao ZC, Wu ZY, Cao YP, et al. Molecular characteristic of *mcr-1* producing *Escherichia coli* in a Chinese university hospital. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017; 16:32.
17. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(4):1151-1161.
18. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13(9):785-796.
19. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(1):333-334.
20. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6):2702.

21. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(1):559-562.
22. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3):969-976.
23. Magagnin CM, Campos JC, Rocha DA, Sampaio SCF, Rozáles FP, Barth AL, et al. Dissemination of *bla*_{OXA-370} is mediated by IncX plasmids and the Tn6435 transposon. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018; 37(11):2165-2169.
24. Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozáles FP, Magagnin CM, Falci DR, et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(6):3566-3567.
25. Pereira PS, Borghi M, de Araújo CF, Aires CAM, Oliveira JC, Asensi MD, et al. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(8):4453-4456.
26. Poirel L, Dordet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(11):5403-5407.
27. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence typing 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(12):5046-5054.
28. Carvalho-Assef APD, Pereira OS, Albano RM, Berião RM, Chagas TPG, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Anitmicrob Chemother.* 2013; 2956.
29. Ferreira AM, Mondelli AL, Soares de Campos e Silva JG, Javaroni E, de Souza Gambarini P, Garcia DO, et al. First report of a clinical isolate of New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Hosp Infect.* 2016; 94(1):73-74.

30. Diep JK, Sharma R, Ellis-Grosse EJ, Abboud CS, Rao GG. Evaluation of activity and emergence of resistance of polymyxin B and ZTI-01 (fosfomycin for injection) against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(2):1-11.
31. Bartolleti F, Seco BMS, Santos CP, Felipe CB, Lemo MEB, Alves TS, et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22(10):1849-1851.
32. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005; 40(1):1333-1341.
33. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critic Care*. 2006; 10(1):R27.
34. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21(3):449-465.
35. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*. 2006; 6(9):589-601.
36. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12:315-321.
37. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. *Future Microbiol*. 2013; 8(6):711-724.
38. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66:2070-2074.

39. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect.* 2012; 73(4):354-360.
40. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne PA; CLSI:2016.
41. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60(6):1206-1215.
42. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST). Tabela de pontos de corte clínicos do BrCAST-EUCAST. BrCAST; 2016.
43. Falagas ME, Bliziotis IA, Kasiakou SK, Samonis G, Athanassapoulou P, Michalopoulos A. Outcome of infectious due to pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacteria. *BMC Infect Dis.* 2005; 5:24.
44. Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TSR, de Almeida Jr.JN, Duarte AJS. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *Braz J Infect Dis.* 2017; 21(1):98-101.
45. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(5):2780-2784.
46. Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol.* 2016; 47S:31-37.
47. Braun G, Cayô R, Matos AP, Fonseca JM, Gales AC. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; 51(3):522-527.
48. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers Microbiol.* 2014; 5(643):1-18.

49. Gooderham WJ, Hancock REW. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two component systems in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Rev. 2009; 33:279-294.
50. Groisman EA, Kayser J, Soncini FC. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. J Bacteriol. 1997; 179(22):7040-7045.
51. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2015; 70:75-80.
52. Mitrophanov AY, Jewett MW, Hadley TJ, Groisman EA. Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. PLoS Genetics. 2008; 4(10):e1000233.
53. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(10):5696-5703.
54. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and humans beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016; 16(2):161-168.
55. Quan J, Li X, Chen Y, Jiang Y, Zhou Z, Zhang H, et al. Prevalence of *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study. Lancet Infect Dis. 2017. 17(4):400-410.
56. Overejo CM, Delgado-Blas JF, Calero-Caceres W, Muniesa M, Gonzalez-Zorn B. Spread of *mcr-1*-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. J Antimicrob Chemother. 2017; 72(4):1050-1053.
57. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Sigh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveil. 2016; 21(27).

58. Zurfluh K, Stephan R, Widmer A, Poirel L, Nordmann P, Nüesch HJ, et al. Screening for fecal carriage of MCR-producing Enterobacteriaceae in healthy humans and primary care patients. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017; 6:28.
59. Liassine N, Assouvie L, Descombes MC, Tendon VD, Kieffer N, Poirel L, et al. Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract Enterobacteriaceae in Switzerland. *Int J Infect Dis*. 2016; 51:4-5.
60. Wang Y, Tian GB, Zhang R, Shen Y, Tyrrell JM, Huang X, et al. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of mcr-1-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(4):390-399.
61. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Comunicado de risco nº01/2016 – GVIMS/GGTES/ANVISA: Detecção do gene responsável pela resistência à polimixina mediada por plasmídeos (*mcr-1*) no Brasil. ANVISA; 2016.
62. Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, Moura Q, Pérez-Chaparro PJ, Esposito F, et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(10):6415-6417.
63. Giani T, Arena F, Vaggelli G, Conte V, Chiarelli A, De Angelis LH, et al. Large nosocomial outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* traced to clonal expansion of an *mgrB* deletion mutant. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(10):3341-3344.
64. Zavascki AP, Girardello R, Magagnin CM, Antochévis LC, Maciel RA, Palmeiro JK, et al. Emergence of polymyxin B resistance in a polymyxin B-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infection in a neutropenic patient during polymyxin B therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018; 90(2):134-138.
65. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knows and unknowns. *Int J Antimicrob Agents*. 2016; 48(6):583-591.

66. Möhler JS, Kolmar T, Synnatschke K, Hergert M, Wilson LA, Ramu S, et al. Enhancement of antibiotic-activity through complexation with metal ions – Combined ITC, NMR, enzymatic and biological studies. *J Inorg Biochem.* 2017; 167:134-141.
67. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Wang J, Thompson PE, Li J. Teaching “old” polymyxins new tricks: new-generation lipopeptides targeting Gram-negative “superbugs”. *ACS Chem Biol.* 2014; 9:1172-1177.
68. Cohen SM. New approaches for medical applications of bioinorganic chemistry. *Curr Opin Chem Biol.* 2007; 11(2):115-20.
69. Ming LJ, Epperson JD. Metal binding and structure – activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *J Inorg Biochem.* 2002; 91:46-58.
70. Chohan ZH, Naseer M. Metal-based sulfonamides: synthesis, characterization, antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of pyrrolyl- and thienyl-derived compounds. *Appl Organometal Chem.* 2007; 21:728-738.
71. Martins DA, Gouvea LR, Muniz GSV, Louro SRW, Batista DGJ, Soeiro MNC, et al. Norfloxacin and N-donor mixed-ligand copper(II) complexes: synthesis, albumin interaction, and anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Bioinorg Chem Appl.* 2016. 2016: 5027404.
72. Bruijninx PCA, Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr Opin Chem Biol.* 2008; 12(2):197-206.
73. Stokowa-Soltys K, Kasproicz A, Wrzesinski J, Ciesiolka J, Gaggelli N, Gaggelli E, et al. Impact of Cu^{2+} ions on the structure of colistin and cell-free system nucleic acid degradation. *J Inorg Biochem.* 2015; 161:67-74.
74. Jezowska-Bojczuk M, Stokowa-Soltys K. Peptides having antimicrobial activity and their complexes with transition metal ions. *Eur J Med Chem.* 2018; 143:997-1009.
75. Brown P, Dawson MJ. Development of new polymyxin derivatives for multi-drug resistant Gram-negative infections. *J Antibiot (Tokyo).* 2017; 70(4):386-394.
76. Giacobbe DR, Del Bono V, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Bassetti M, et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-

producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case-control-control study. Clin Microbiol Infect. 2015; 21(12): 1106.e1-8.

77. Rojas LJ, Salim M, Cober E, Richter SS, Perez F, Salata RA, et al. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory detection and impact of mortality. Clin Infect Dis. 2017; 64(6):711-8.
78. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledrandi M, Ballardini M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. Clin Microbiol Infect. 2013; 19(1):E22-E30.
79. Teo JQ, Chang CW, Leck H, Tang CY, Lee SJ, Cai Y, et al. Risk factors and outcomes associated with the isolation of polymyxin B and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae spp.: A case-control study. Int J Antimicrob Agents. 2019; 53(5):657-662.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metalofármaco através da complexação do íon metálico cobre (Cu^{2+}) à molécula de sulfato de polimixina B e avaliar sua atividade antimicrobiana frente a espécimes previamente selecionados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e à polimixina B.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o complexo antimicrobiano-metal através de reação de coordenação entre sulfato de polimixina B e cobre (II).
- Caracterizar a estrutura molecular do complexo antimicrobiano-metal através de técnicas de análise química.
- Determinar a atividade antimicrobiana do complexo antimicrobiano-metal gerado através da determinação da MIC por técnica de microdiluição em caldo.

Manuscrito

Polymyxin B Copper (II) Complex: synthesis, characterization and biological activity assessment against extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*

Rafael Vecchi¹, Aniele de Moura², Adriano de Souza Pessoa³, Carlos Henrique Camargo⁴, Flávio Junior Caires^{2,5}, James Venturini^{1,6}

¹ São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medicine School, Tropical Diseases and Imaging Diagnosis Department, 18618-687, Botucatu, SP, Brazil

² São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Chemistry Department, 17033-260, Bauru, SP, Brazil

³ University of São Paulo (USP), Bauru School of Dentistry, Department of Biological Sciences, 17012-901, Bauru, SP, Brazil

⁴ Adolfo Lutz Institute (IAL), Enteric Diseases and Special Pathogens Center, Bacteriology Center, 01246-000, São Paulo, SP, Brazil

⁵ São Paulo State University (UNESP), Institute of Chemistry, 14800-060, Araraquara, SP, Brazil

⁶ Federal University Mato Grosso do Sul (UFMS), School of Medicine, 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil

Corresponding author: James Venturini – e-mail: james.venturini@ufms.br

Keywords: polymyxin B, copper (II) complex, *Klebsiella pneumoniae*, multidrug-resistance

ABSTRACT

The increase of multidrug-resistant Gram-negative bacilli is a matter of worldwide relevance. Therefore, the development of new antimicrobials drugs is necessary. In this context, coordination of metal ions to drugs has emerged as one exciting strategy for the development of compounds with antimicrobial activities. In the present study, we synthesized and characterized a complex formed by a coordination reaction between polymyxin B sulfate and copper (II) ions. We also determined the antimicrobial activity of copper (II) complex against carbapenem- and polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CPRKp). Our findings showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of the copper complex was 44.4% lower, 33.3% was equal, and 22.23% was higher than polymyxin B in the CPRKp isolates. These results are encouraging and should lead to further studies about toxicity and *in vivo* activity of the copper (II) complex.

1. INTRODUCTION

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative microorganism very prevalent in the hospital setting, causing infections in several body sites associated with high rates of morbidity and mortality. The isolation of drug-resistant strains such as carbapenem and polymyxin B has led to a serious public health problem, resulting in a shortage of alternatives for the treatment of this infections¹⁻³.

Polymyxin B, an antibiotic used primarily for resistant Gram-negative infections, is a positively charged cyclic cationic polypeptide antimicrobial and interacts electrostatically with the lipid A fraction of the negatively charged bacterial lipopolysaccharide (LPS), promoting the displacement of the bridges formed by divalent ions (Mg^{2+} and Ca^{2+}) acting to stabilize its structure. The side chains of polymyxin B, which have the terminal fatty acid, also interact with LPS, contributing to the complexation between the drug and the outer membrane. The result of this interaction is the destruction of the bacterial outer membrane, with an increase of its permeability, extravasation of the cytoplasmic content and its rupture, culminating in the cellular death⁴⁻¹¹.

Resistance to polymyxin B is mediated by chromosomal mechanisms related to environmental stimuli or mutations in the chromosomal genes of the Two-Component Systems (TCS)¹²⁻¹⁴, and enzymes loaded by mobile genetic elements, such as MCR^{15,16}.

In this context, the research for new antimicrobials is extremally urgent¹⁷⁻²¹. Several approaches have been employed, including the complexation of metals with antimicrobials²²⁻²⁵. The interaction between a metal ion and an organic compound results in a coordination compound with new properties such as molecular structure,

thermodynamic aspects, thermal stability, and reactivity^{24,26}. Several reports have demonstrating an improvement of the biological activity by several compounds complexed with transitional metals²⁴⁻²⁶. Therefore, the aim of this study was to synthesize and characterize a copper (II) complex with polymyxin B and evaluate its antimicrobial activity against selected isolates of carbapenem- and polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CPRKp).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Selection of specimens

Eighteen CPRKp isolates were obtained from April 2016 to November 2018 at the Bauru State Hospital (HEB), a tertiary hospital that serves patients from the city of Bauru, State of São Paulo, Brazil. The resistance to carbapenem and polymyxin B were initially reported by the Vitek® 2 Compact automatized platform (BioMérieux). Next, we confirmed the resistance the polymyxin B by broth microdilution technique, the gold standard test for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) values according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)²⁷ for confirmation of resistance to this drug. The samples were aliquoted into tryptone soy broth (TSB) with 10% glycerol (v/v) and stored in a freezer at -80 °C until the tests are performed.

2.2. Synthesis of copper (II) complex

The 1 mmol mass of polymyxin B sulfate salt (Sigma-Aldrich) was solubilized in distilled water and then deprotonated by the dropping of a 0.1 mol L⁻¹ aqueous sodium hydroxide solution, the solution pH was 6.5. After generation of the

sodium ligand, this was added to a 3 mmol ethanolic solution of copper chloride (Sigma-Aldrich). This final solution was heated in conventional microwave oven for 60 seconds, with the formation of blue precipitate which was centrifuged and washed with distilled water, until sulfate and chloride were not detected by qualitative tests with BaCl_2 and $\text{AgNO}_3/\text{HNO}_3$, respectively.

2.3 Characterization of copper (II) complex

Simultaneous Thermogravimetry- Differential Thermal Analysis (TG-DTA)

Simultaneous TG-DTA curves were obtained using the thermal analysis system from Netzsch, model STA 449 F3. Approximately 5 mg of sample were weighed and placed in a 200 μL α -alumina open crucible. The parameters were set at a heating rate of $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, and a flow rate of 50 mL min^{-1} in a dry air atmosphere. The temperature range was from $30\text{ }^\circ\text{C}$ to $1000\text{ }^\circ\text{C}$. When necessary, the measurement was performed under an inert atmosphere (N_2), using the same conditions mentioned above. Were applied to TG curve, the first derivative (DTG) to better comprehend the curves, hence the curves are shown together with the TG-DTA curves (as TG/DTG-DTA curves).

Complexometry

The preparation of the metal ion solution was based on the calcination of 100 mg in a muffle furnace at $800\text{ }^\circ\text{C}$ for 40 minutes, for conversion of the complex to its respective oxide. Thereafter, the resultant product of this calcination was dissolved in concentrated hydrochloric acid. After this, excess hydrochloric acid was removed and the volume was made up with distilled water. From complexometry with EDTA solution (Sigma-Aldrich), acting as complexing agent, at a concentration of $1 \times 10^{-2}\text{ mol}$

L⁻¹, it was possible to determine the total content of the metal ion. 1 mg murexide was used as a titrating indicator. Titrations were performed in triplicate with 1 mL aliquots of metal chloride solutions.

Mid-infrared Spectroscopy (MIR)

The MIR spectrum was recorded on a Thermo Scientific Nicolet iS10 IR spectrophotometer, through the attenuated total reflectance technique with germanium crystal, in the range between 675 cm⁻¹ to 4000 cm⁻¹, 4 cm⁻¹ resolution and 32 scans per spectrum.

X-ray powder Diffractometry (XRPD)

The crystallinity of the worked compounds was evaluated by the XRPD technique. X-ray powder diffractograms were obtained on the Rigaku MiniFlex 600 diffractometer using a 20 kV copper tube, 20 mA current, Cu $\kappa\alpha$, $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$, in the range of 10-80°, with a step of 10° per minute.

2.4. Broth microdilution for copper chloride, polymyxin B and copper (II) complex

Broth microdilution was performed according to the methodology described according to the guidelines of EUCAST²⁷ for aerobic bacteria, with modifications. Bacterial suspension was prepared from the turbidity of sterile physiological saline up to 0.5 on the McFarland scale, equivalent to $1.5 \times 10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$ as determined by DensiCHEK Plus (BioMérieux) equipment. These solutions were then diluted to a concentration of $2.5 \times 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$, ideal for the assay. Copper chloride, polymyxin B and copper (II) complex were suspended in a solution of propyleneglycol (PPG) / phosphate buffered saline (PBS) (1:1) at the concentration of 1 mg mL^{-1} (stock

solution). Subsequently, serial dilution with cation-adjusted Müller-Hinton (CAMH) broth was performed to obtain different concentrations of the drugs, starting from the stock solution. Then, in 96-well polystyrene microplate were added 50 μL of the different concentrations of the compounds, 50 μL of the bacterial suspension containing 2.5×10^5 CFU mL^{-1} and incubated at 36 ± 1 °C for 18-24 hours. Afterward, the microplates were incubated at 36 ± 1 °C for 18-24 hours. The MIC was visually determined as the first well that did not show turbidity after incubation. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853™ and *Escherichia coli* ATCC® 25922™ standard strains were also tested for validation of each microplate. Each assay was tested in duplicate for each compound.

2.5. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

PFGE typing of the isolates was performed according to the modified protocol of McDougal *et al.*²⁸. Similarity analysis was performed using BioNumerics® software (version 7.1; Applied Maths, Belgium). Dendrogram creation was performed by Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) with band position tolerance and optimization adjusted to 1.25 and 0.5% respectively. The Dice similarity coefficient $\geq 80\%$ was chosen to determine clusters.

3. RESULTS AND DISCUSSION

For the characterization of the synthesized copper (II) complex several techniques were performed. First, TG/DTG-DTA curves provided information about the thermal behavior of the ligand (polymyxin B) and the coordination compound, furthermore by the analyzing of copper (II) complex residue (metal oxide) it was possible to suggest its minimum formula^{29,30}. TG/DTG-DTA techniques for polymyxin

B are shown in Figure 1. In it, it can be observed that the compound presents at least four steps of mass loss and that the anhydrous compound exhibits thermal stability up to 173 °C. The first step of mass loss was observed in the range temperature of 30 °C to 173 °C ($\Delta m = 5.03\%$), which refers to the loss of water; this is probably due to the adsorbed water by the compound, once it is hygroscopic. Subsequently, the second mass loss step was observed between 173 °C to 316.5 °C ($\Delta m = 25.95\%$), associated to the exothermic event in 232 °C in the DTA curve. The third step of mass loss occurred between 316.5 °C to 456.4 °C ($\Delta m = 15.95\%$). The fourth step of mass loss occurred between the range temperature 456.4 °C to 714.1 °C ($\Delta m = 40.48\%$), associated to the exothermic peak at 536.2 °C in the DTA curve, related to degradation of the organic matter of the compound.

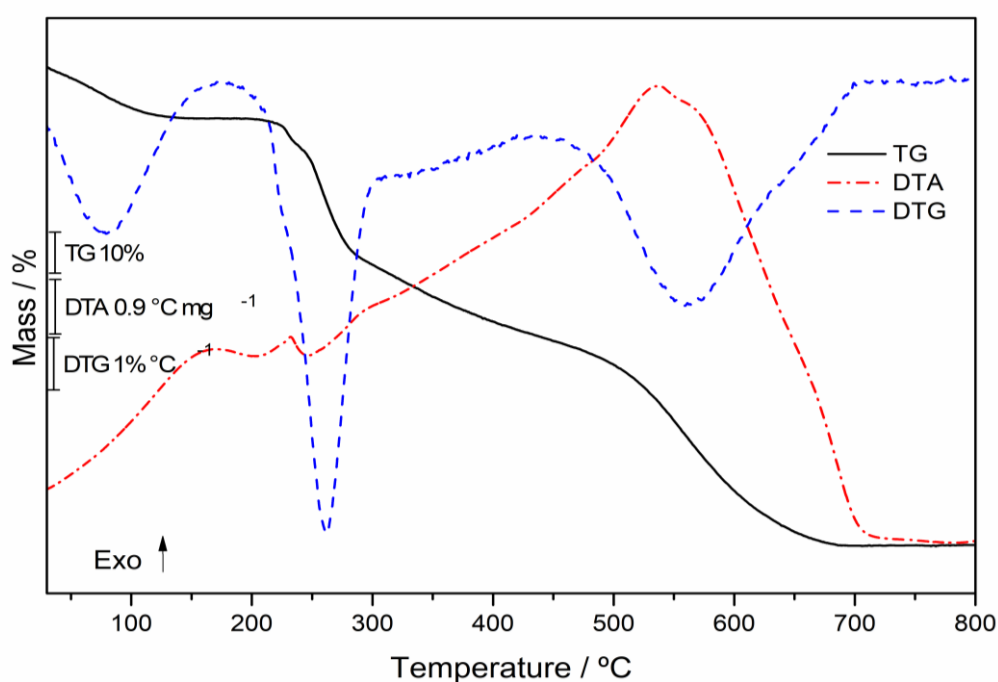


Figure 1. TG/DTG-DTA curves of the polymyxin B ligand in a dry air atmosphere.

It was not possible to observe the fusion of this compound in an oxidizing atmosphere, since the DTA curve does not suggest any characteristic endothermic

events. In order to evaluate the action of the atmosphere on this compound, the sample was subjected to heating under N₂ atmosphere. TG/DTG-DTA curves to polymyxin B under inert atmosphere can be observed in Figure 2.

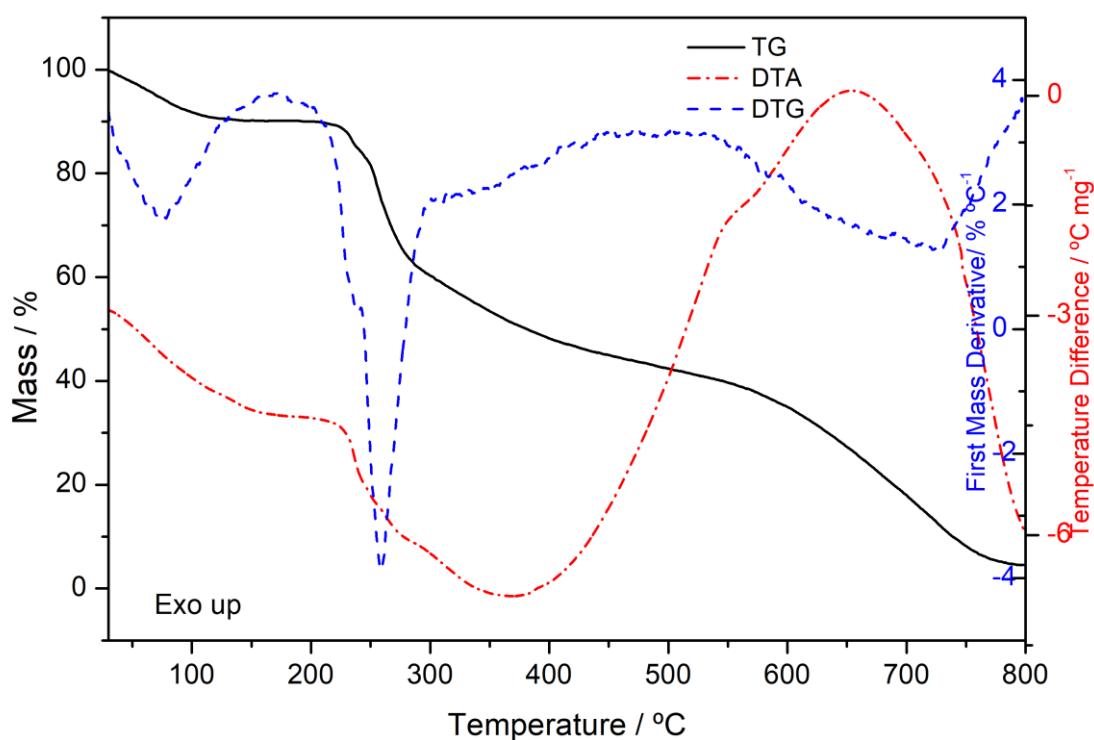


Figure 2. TG/DTG-DTA curves of the polymyxin B ligand in N₂ atmosphere.

As shown, the compound degrades into three stages of mass loss as suggested by the TG curve. The first stage of mass loss occurs between 30 °C and 132.8 °C ($\Delta m = 9.30\%$), while the second stage occurs between 132.8 °C and 300.1 °C ($\Delta m = 30.15\%$). However, according to the DTG curve, this mass loss step is a complex event with overlapping stages, which are associated with the exotherm indication between 196.7 °C to 250.2 °C. The last stage of mass loss occurs between 300.1 °C

to 797.7 °C ($\Delta m = 55.75\%$) and is associated with exotherm event between 461.2 °C to 796.2 °C. The presence of 4.80% residue occurs because the atmosphere is not oxidizing and part of the compound is not degraded. As in oxidizing atmosphere, no fusion point was observed for polymyxin B in inert atmosphere, demonstrating that it does not overlap this event.

The TG/DTG-DTA curves of copper (II) complex (Figure 3) shown four mass loss steps. The first step occurs between 30 °C to 159.5 °C, and may be associated with the loss of seven water molecules of hydration ($\Delta m_{\text{calc}} = 8.40\%$, $\Delta m_{\text{TG}} = 8.35\%$). Then, according to the DTG curve, two overlapped mass loss steps were observed in the temperature range of 159.5 °C to 238.9 °C and 238.9 °C to 392.4 °C, due to the degradation of the ligand. The fourth and final step of thermal degradation of the complex are observed between 392.4 °C and 557.8 °C and is associated to the exothermic peak at 473.8 °C in the DTA curve, respective to the oxidation of carbonized material. The residue ($\Delta m_{\text{TG}} = 15.56\%$) is relative to copper oxide (CuO), and is in agreement with the calculated value ($\Delta m_{\text{calc}} = 15.80\%$). Therefore, it is suggested that the minimum formula for the complex is $[\text{Cu}_3pb] \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

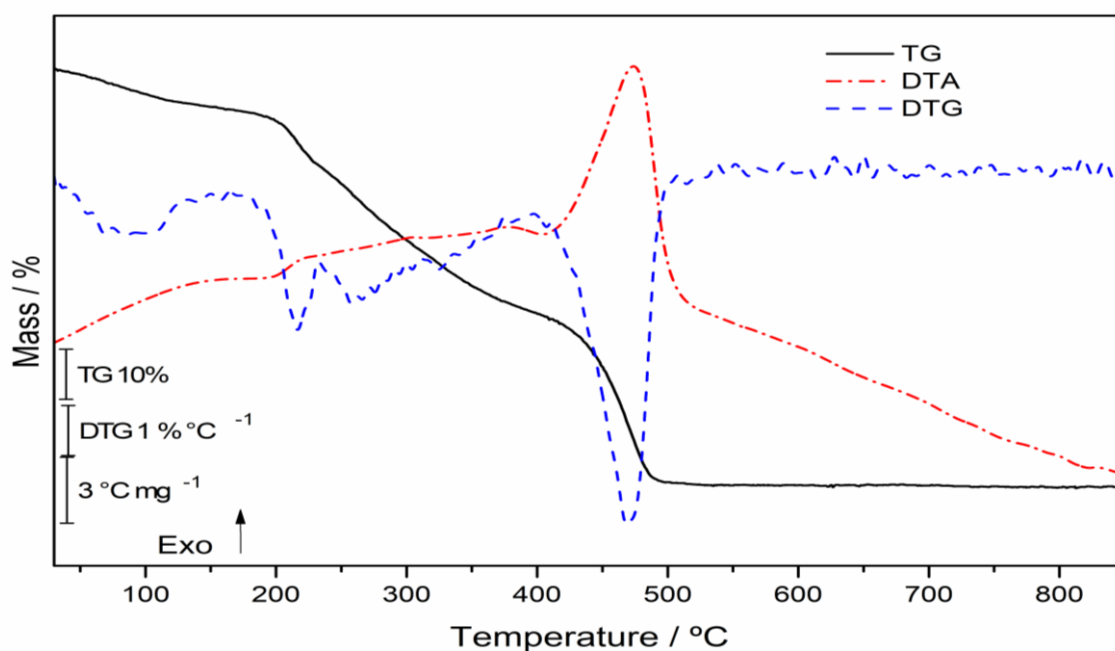


Figure 3. TG/DTG-DTA curves of the copper (II) complex in a dry air atmosphere.

Table 1 shows the mass loss steps and peak temperature observed for the polymyxin B (ligand) and the copper (II) complex in dry air atmosphere.

Table 1: Temperature ranges ($\theta/^{\circ}\text{C}$), mass loss (Δm) and peak temperature (T_P) observed at each step in the TG/DTG-DTA curves of the ligand (polymyxin B) and the copper (II) complex in dry air atmosphere.

Compound		1 st step	2 nd step	3 rd step	4 th step
Polymyxin B	$\theta/^{\circ}\text{C}$	30.0-173.0	173.0-316.5	316.5-456.4	456.4-714.1
	$\Delta m/\%$	5.03	25.95	15.25	40.48
	$T_P/^{\circ}\text{C}$		232.0 $\uparrow$		536.2 $\uparrow$
[Cu ₃ pb]·7H ₂ O	$\theta/^{\circ}\text{C}$	30-159.5	159.5-238.9	238.9-392.4	392.4-557.8
	$\Delta m/\%$	8.40	12.17	27.83	36.04
	$T_P/^{\circ}\text{C}$				473.8 $\uparrow$

$\uparrow$ =exothermic peak

Then, [Cu₃pb] complexometry was performed and copper oxide theoretical and the one formed after calcination at 800 °C diffractograms were compared, as

shown in the Figures 4.a and 4.b, respectively. Analyzing the diffractograms, it is clear that the peaks are equivalent, mainly the most intense at 35.62° and 38.65° (highlighted in red). Thus, it is possible to state that the calculations performed from the copper (II) complex TG curve are in concordance with the final residue (CuO) and the error allowed by the technique.

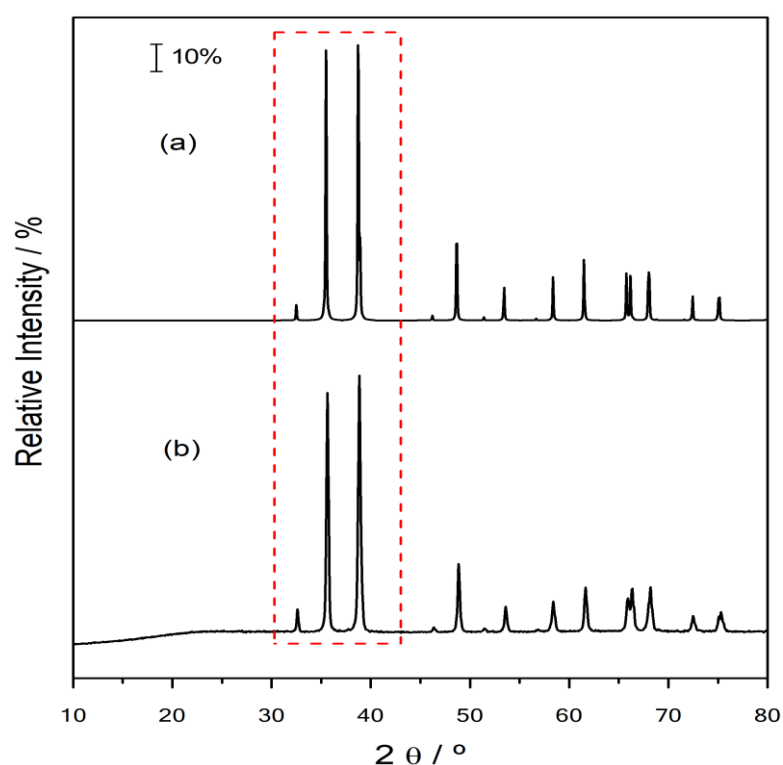


Figure 4. Theoretical (Program Mercury) (a) and calcined (b) copper (II) oxide diffractogram by complexometry.

According to the complexometry calculations, the percentage of copper present in the calcined metal oxide was obtained. The copper content was 12.53%, while according to the data obtained by the TG curve these values are 12.43%, which

are in accordance with the proposed minimum formula considering the TG residue of 15.56%.

In order to obtain structural information about the compounds, the MIR technique was employed. Analyzing the MIR spectrum of polymyxin B (Figure 5.a), was observed a broad band between 3600 and 3420 cm^{-1} , relative to the O-H stretch, while the bands at 3057 and 2057 cm^{-1} was attributed to C-H sp^3 stretches. The intense bands at 1647 and 1533 cm^{-1} were related to carbonyl stretches and angular deformations of N-H bond, respectively.

Analysis of copper (II) complex MIR spectrum (Figure 5.b) revealed that the O-H band is more pronounced; this is due to the presence of water of hydration in the coordination compound. Moreover, were observed that the band related to the angular deformation band of N-H is displaced (1537 cm^{-1}), and was observed a new band at 1546 cm^{-1} . This suggests that there may have been an interaction of metal with this group. However, since the O-H band overlaps the N-H stretch bands of the ligand, and the structural complexity of the molecule, coupled with the failure to synthesize a single crystal, it is difficult to confirm that coordination occurs exactly with these groups.

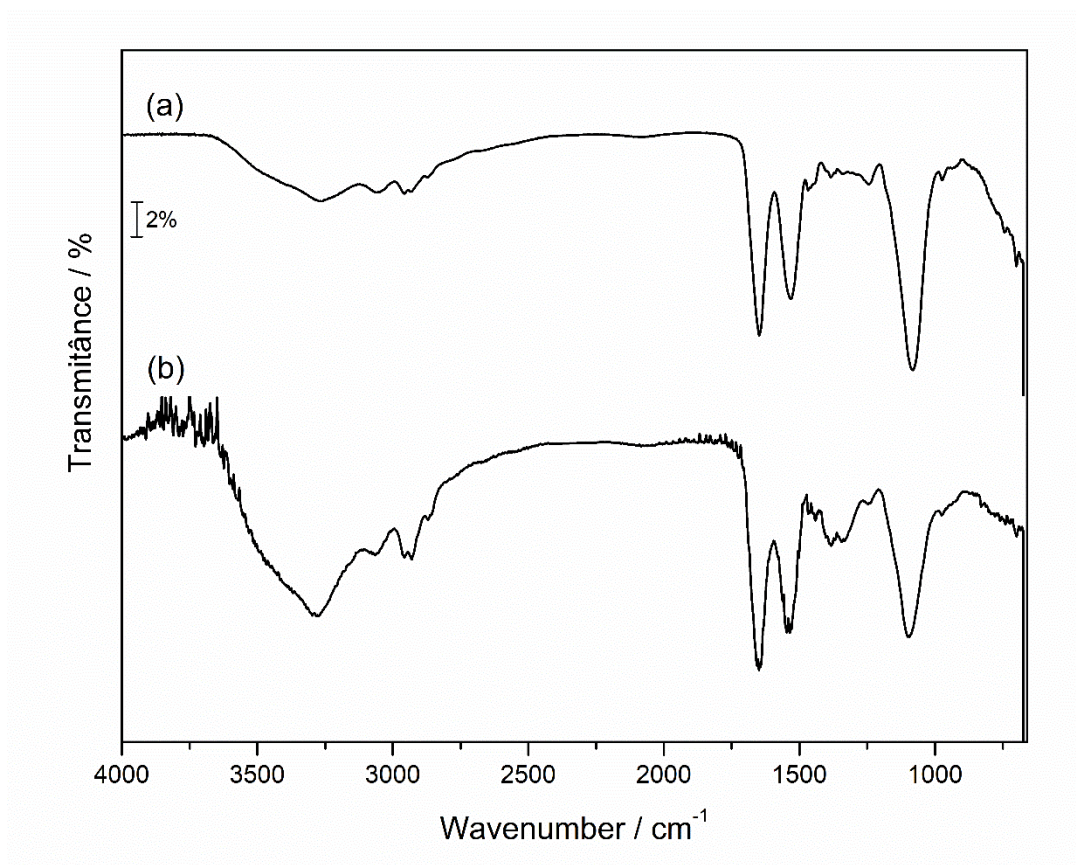


Figure 5. MIR spectrum of the polymyxin B (a) and copper (II) complex (b).

Finally, XRPD crystallography was performed and the polymyxin B and copper (II) complex diffractograms are shown in Figure 6. As can be seen, the polymyxin B diffractogram (Figure 6.a) shows that the compound is not crystalline, unlike the complex (Figure 6.b), which even having a halo amorphization, presents a more crystalline diffraction pattern when compared to polymyxin B, with higher peaks at 16.29° , 31.75° , 35.61° and 39.79° .

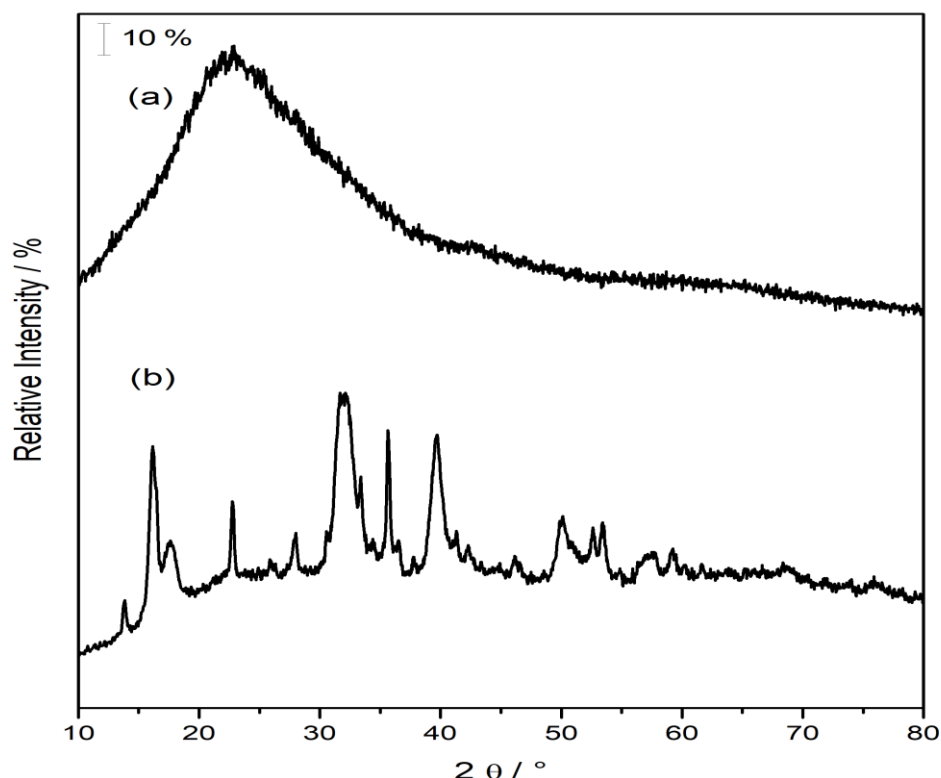


Figure 6. Diffractogram of polymyxin B (a) and copper (II) complex (b) according to the XRPD.

After synthesis and characterization steps, the biological activity of the copper (II) complex was evaluated for 18 isolates of CPRKp and compared with polymyxin B. In addition, PPG and copper chloride tests were also performed to ensure that, at the concentrations used, it did not exert direct activity on the tested bacterial suspension, inhibiting its growth.

As demonstrated in the Figure 7, MICs of the copper (II) complex were 44.4% lower, 33.3% was equal, and 22.23% was higher in the CPRKp isolates than MIC's polymyxin B. For copper chloride was higher than 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$, maximum concentration tested, for all samples.

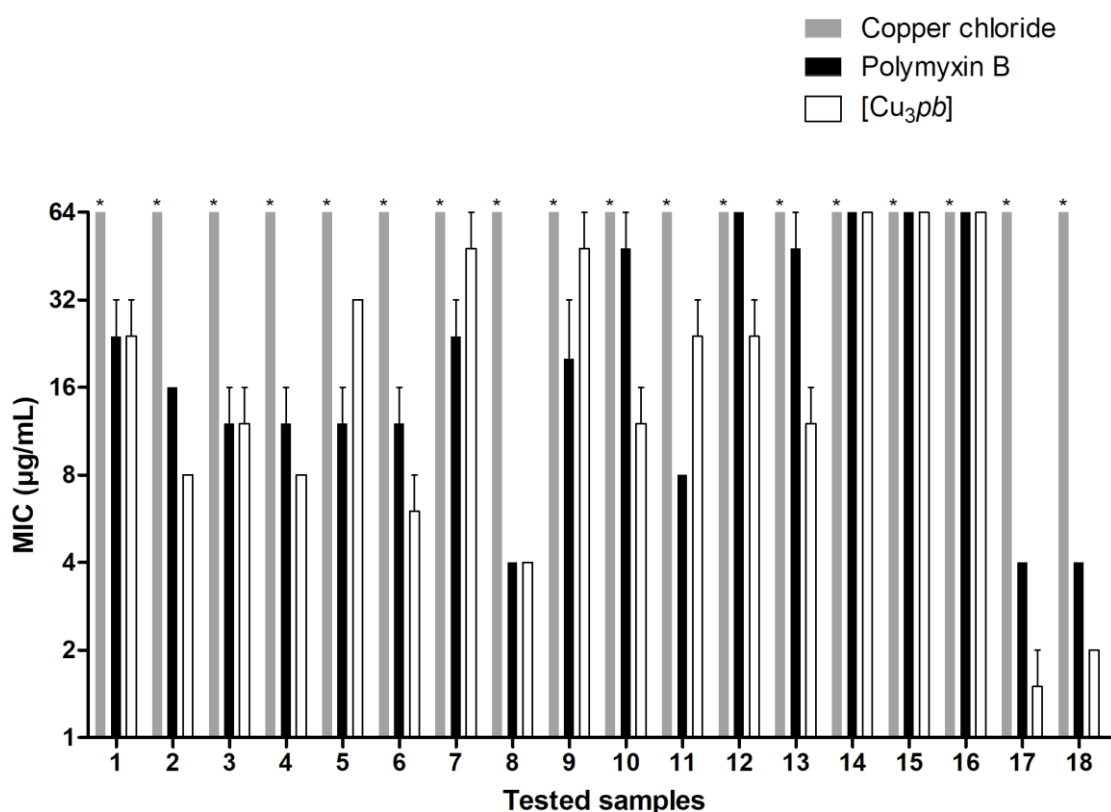


Figure 7. Biological activity determination of copper chloride, polymyxin B and $[\text{Cu}_3\text{pb}]$ complex by broth microdilution technique ($\mu\text{g mL}^{-1}$) against 18 isolates of CPRKp (tested in duplicate).

* Highest concentration tested.

Initially, it may be noted that the binding of Cu^{2+} ions to polymyxin B generated significant structural modifications therein, since the complex generated became insoluble in various solvents, such as water and dimethyl sulfoxide (DMSO), for example, while the secondary pattern polymyxin B used as the basis for the synthesis was highly soluble therein. Furthermore, differences in MIC values between polymyxin B and $[\text{Cu}_3\text{pb}]$ obtained from the 18 isolates of CPRKp can be attributed to specific differences between the isolates tested.

In order to understand these specific differences, the PFGE technique was proposed to determine the clonality of the 18 isolates tested. The analysis of the dendrogram created (Figure 8) showed that there were several distinct clones between them and that, even within the same cluster, the effectiveness of the copper (II) complex ranged from higher, equivalent or lower compared to polymyxin B. Thus, it is possible to state that the clonality of the isolates is not a determining factor for understanding the difference in effectiveness of the complex $[Cu_3pb]$ between the different CPRKp isolates tested, however, there must be other factors that help us explain this difference in effectiveness.

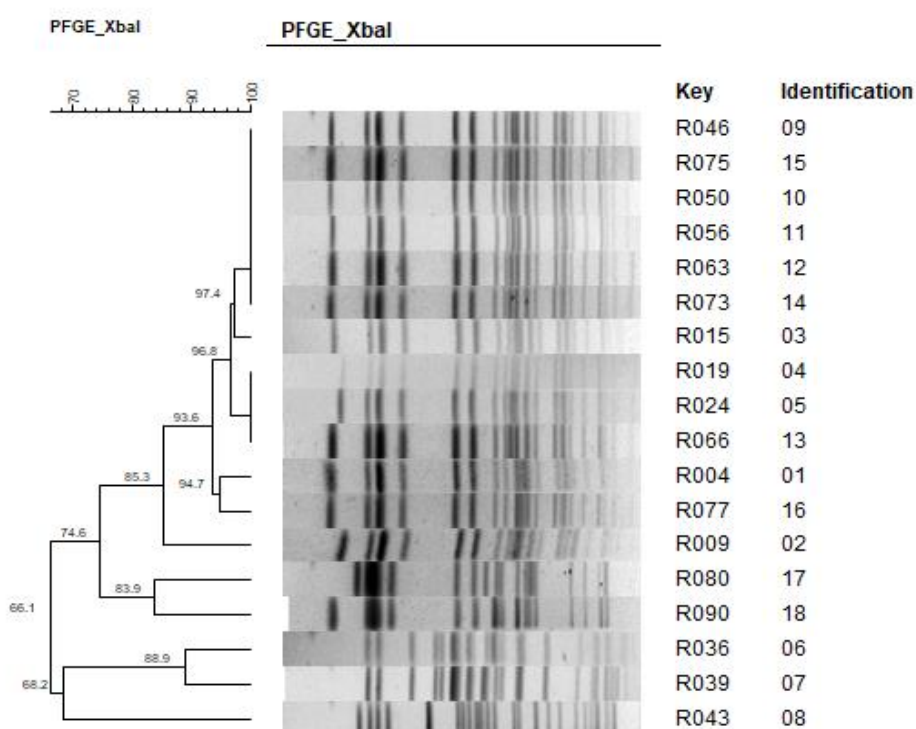


Figure 8. Dendrogram showing the clonality of the 18 isolates tested against the copper (II) complex.

The coordination of drugs with antimicrobial activity to metal ions aims to generate compounds that present biological activity superior to the drugs used as the

basis for the synthesis. This approach has already been employed in the research for new drugs. Cohan *et al.* showed that the coordination of metal ions to sulfonamides generated complexes with significant to moderate biological activity when tested against different microorganisms³¹. Martins *et al.* showed that norfloxacin coordinated to copper (II) ions is more active in relation than free fluoroquinolone against bloodstream trypomastigotes³². In addition, Stokowa-Soltys *et al.* demonstrated that colistin is able to efficiently chelate Cu^{2+} ions, exert oxidative activity and promote the destruction of DNA plasmids when accompanied by hydrogen peroxide or ascorbic acid²⁵.

Thus, the introduction of the Cu^{2+} metal ion to the polymyxin B molecule aims to make it more effective for the CPRKp isolates, reducing the effects of the reduction in the number of negative charges on the lipid A fraction of the bacterial LPS due to the various polymyxin B resistance mechanisms. It should be noted that the metal ion itself exerts antibacterial activity and because this characteristic was selected for the coordination reaction with polymyxin B. Further studies should be conducted with the objective of determining other characteristics of the synthesized complex, such as its activity *in vivo*, toxicity and the reason for the difference in effectiveness found among CPRKp isolates.

4. CONCLUSION

Through the TG / DTG-DTA curves it was possible to suggest the minimum formula of the complex as $[\text{Cu}_3pb].7\text{H}_2\text{O}$ and using MIR it can be suggested that Cu (II) coordinates with polymyxin B with amino and hydroxyl groups. The evaluation of the biological activity of the coordination complex in the CPRKp isolates showed that

it was more active in 44.44% of the specimens tested than polymyxin B. Therefore, the excellent results obtained in this preliminary study with the $[\text{Cu}_3pb]$ complex should stimulate further research aimed at understanding their bacterial activity, toxicity and the differences between the isolates that culminated in different results.

Author Statement

Authors and contributors

Rafael Vecchi contributed to conceptualisation, methodology, validation, investigation, resources and writing – original draft preparation of the manuscript. Aniele de Moura contributed to methodology, validation, investigation, resources and writing – original draft preparation of the manuscript. Adriano de Souza Pessoa and Carlos Henrique Camargo contributed to investigation. Flávio Júnior Caires contributed to methodology, resources, writing – review and editing and supervision. James Venturini contributed to conceptualisation, methodology, resources, writing – review and editing and supervision.

Conflicts of interests

“The authors declare that they have no competing interests.”

Funding information

“This work received no specific grant from any funding agency.”

Ethical approval

Approval of the Scientific and Research Ethics Committees of São Paulo State University (protocol number 2.512.274).

REFERENCES

1. Ah YM, Kim AJ, Lu JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Int J Antimicrob Agents. 2014; 44(1):8-15. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.02.016.
2. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(10):5875-5884. doi:10.1128/AAC.01019-15.
3. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8:4. doi:10.3389/fcimb.2018.00004.
4. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis. 2005; 40(1):1333-1341. doi:10.1086/429323.
5. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. Crit Care. 2006; 10(1):R27. doi:10.1186/cc3995.
6. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(3):449-465. doi:10.1128/CMR.00006-08.
7. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis. 2006; 6(9):589-601. doi:10.1016/S1473-3099(06)70580-1.

8. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme (2001-2004). Clin Microbiol Infect. 2006; 12:315-321. doi:10.1111/j.1469-0691.2005.01351.x.

9. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. Future Microbiol. 2013; 8(6):711-724. doi:10.2217/fmb.13.39.

10. Bartolleti F, Seco BMS, Santos CP, Felipe CB, Lemo MEB, Alves TS, et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. Emerg Infect Dis. 2016; 22(10):1849-1851. doi: 10.3201/eid2210.160695.

11. Deris ZZ, Swarbrick JD, Roberts KD, Azad MAK, Akter J, Horne AS, et al. Probing the penetration of antimicrobial polymyxin lipopeptides into Gram-negative bacteria. Bioconjugate Chem. 2014; 25: 750-760. Doi:10.1021/bc500094d.

12. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(5):2780-2784. doi:10.1128 /AAC.05055-14.

13. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Frontiers Microbiol. 2014; 5(643):1-18. doi:10.3389/fmicb.2014.00643.

14. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella*

- pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 2015; 70:75-80. doi:10.1093/jac/dku323.
15. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and humans beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016; 16(2):161-168. doi:10.1016/s1473-3099(15)00424-7.
 16. Conceição-Neto OC, Aires CAM, Pereira NF, Silva LHJ, Picão RC, Siqueira BN, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61(7):e00317-17. doi:10.1128/AAC.00317-17.
 17. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Wang J, Thompson PE, Li J. Teaching “old” polymyxins new tricks: new-generation lipopeptides targeting Gram-negative “superbugs”. ACS Chem Biol. 2014; 9:1172-1177. doi:10.1021/cb500080r.
 18. Brown P, Dawson MJ. Development of new polymyxin derivatives for multi-drug resistant Gram-negative infections. J Antibiot (Tokyo). 2017; 70(4):386-394. doi:10.1038/ja.2016.146.
 19. Molchanova N, Hansen PR, Franzyk H. Advances in development of antimicrobials peptidomimetics as potential drugs. Molecules. 2017; 22: 1430. doi:10.3390/molecules22091430.
 20. Gallardo-Godoy A, Muldoon C, Becker B, Elliott AG, Lash LH, Huang JX, et al. Activity and predicted nephrotoxicity of synthetic antibiotics based on polymyxin B. J Med Chem. 2016; 59:1068-1077. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01593.

21. Gallardo-Godoy A, Hansford KA, Muldoon C, Becker B, Elliott AG, Huang JX, et al. Structure-function studies of polymyxin B lipononapeptides. *Molecules*. 2019; 24:553. doi:10.3390/molecules24030553.
22. Jezowska-Bojczuk M, Stokowa-Soltys K. Peptides having antimicrobial activity and their complexes with transition metal ions. *Eur J Med Chem*. 2018; 143:997-1009. doi:10.1016/j.ejmech.2017.11.086.
23. Cohen SM. New approaches for medical applications of bioinorganic chemistry. *Curr Opin Chem Biol*. 2007; 11(2):115-20. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.07.012.
24. Bruijninx PCA, Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr Opin Chem Biol*. 2008; 12(2):197-206. doi:10.1016/j.cbpa.2007.11.013.
25. Stokowa-Soltys K, Kasproicz A, Wrzesinski J, Ciesiolka J, Gaggelli N, Gaggelli E, et al. Impact of Cu^{2+} ions on the structure of colistin and cell-free system nucleic acid degradation. *J Inorg Biochem*. 2015; 161:67-74. doi:10.1016/j.inorgbio.2015.05.011.
26. Möhler JS, Kolmar T, Synnatschke K, Hergert M, Wilson LA, Ramu S, et al. Enhancement of antibiotic-activity through complexation with metal ions – Combined ITC, NMR, enzymatic and biological studies. *J Inorg Biochem*. 2017; 167:134-141. doi:10.1016/j.inorgbio.2016.11.028.
27. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>.
28. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a National Database. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, 41(11): 5113. 48

29. Bartyzel A. Synthesis, thermal behavior and some properties of Cu(II) complexes with N,O Schiff Bases. *J Ther Anal Calorim.* 2018; 131(2):1221-1233. doi:10.1007/s10973-017-6563-2.
30. Turkyilmaz M, Onder A, Baran Y. Synthesis, spectroscopic and thermal properties of Cu(II), Ni(II) and Pt(II). *J Therm Anal Calorim.* 2012; 107(3):869-875. doi:10.1007/s10973-011-1567-9.
31. Chohan ZH, Naseer M. Metal-based sulfonamides: synthesis, characterization, antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of pyrrolyl- and thienyl-derived compounds. *Appl Organometal Chem.* 2007; 21:728-738. doi:10.1002/aoc.1279.
32. Martins DA, Gouvea LR, Muniz GSV, Louro SRW, Batista DGJ, Soeiro MNC, et al. Norfloxacin and N-donor mixed-ligand copper(II) complexes: synthesis, albumin interaction, and anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Bioinorg Chem Appl.* 2016. 2016: 5027404. doi:10.1155/2016/5027404.

Conclusões

4. CONCLUSÕES

- O complexo de cobre (II) foi sintetizado com sucesso, o que foi demonstrado pelas análises de TG e pelo espectro MIR, que evidenciaram a fórmula mínima do complexo como $[\text{Cu}_3pb].7\text{H}_2\text{O}$ e sugerindo que a interação do íon metálico Cu^{2+} deve ocorrer com as aminas da polimixina B.
- A determinação da atividade biológica do complexo $[\text{Cu}_3pb]$ mostrou-se promissora, uma vez que houve uma melhora da atividade bacteriana do complexo gerado em relação à polimixina B para a maioria dos isolados de CPRKp testados, de modo que novos estudos devem ser dirigidos para a melhor compreensão da atividade do complexo, sua toxicidade e as diferenças entre os isolados que geraram resultados diferentes.

Spéndice

ANEXO 01

Tabela 2. Valores médios de MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para os 18 isolados de CPRKp testados frente a polimixina B (em duplicata).

Amostra	MIC polimixina B ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (primeira replicata)	MIC polimixina B ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (segunda replicata)
01	32	16
02	16	32
03	16	8
04	16	8
05	16	8
06	16	8
07	32	16
08	4	4
09	32	8
10	64	32
11	8	8
12	64	64
13	64	32
14	64	64
15	64	64
16	64	64
17	4	4

18	4	4
----	---	---

ANEXO 02

Tabela 3. Valores médios de MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para os 18 isolados de CPRKp testados frente ao complexo Cu_3pb (em duplicata).

Amostra	MIC Cu_3pb ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (primeira replicata)	MIC Cu_3pb ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (segunda replicata)
01	32	16
02	8	8
03	16	8
04	8	8
05	32	32
06	8	4
07	64	32
08	4	4
09	64	32
10	8	16
11	32	16
12	32	16
13	16	8
14	64	64
15	64	64
16	64	64
17	2	1

18	2	1
----	---	---

ANEXO 03

Tabela 4. Valores médios de MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para os 18 isolados de CPRKp testados frente ao sulfato de cobre (em duplicata).

Amostra	MIC CuSO ₄ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (primeira replicata)	MIC CuSO ₄ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (segunda replicata)
01	64*	64*
02	64*	64*
03	64*	64*
04	64*	64*
05	64*	64*
06	64*	64*
07	64*	64*
08	64*	64*
09	64*	64*
10	64*	64*
11	64*	64*
12	64*	64*
13	64*	64*
14	64*	64*
15	64*	64*
16	64*	64*
17	64*	64*

18	64*	64*
----	-----	-----

* Maior concentração testada, em $\mu\text{g mL}^{-1}$.