

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

REBECA SIQUEIRA RUBENS

SINERGISMO ENTRE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO E
POLIMIXINA B: ALTERNATIVA TERAPÊUTICA FRENTE À RESISTÊNCIA
BACTERIANA

BRASÍLIA - DF

2025

Rebeca Siqueira Rubens

SINERGISMO ENTRE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO E
POLIMIXINA B: ALTERNATIVA TERAPÊUTICA FRENTE À RESISTÊNCIA
BACTERIANA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Tanise Vendruscolo Dalmolin

Brasília - DF

2025

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

CIP - Catalogação na Publicação

Ss Siqueira Rubens, Rebeca.
 SINERGISMO ENTRE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO
 BRASILEIRO E POLIMIXINA B: ALTERNATIVA TERAPÊUTICA FRENTE À
 RESISTÊNCIA BACTERIANA / Rebeca Siqueira Rubens;

 Orientador: Tanise Vendruscolo Dalmolin . Brasília, 2025.
 77 f.

 Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização - Programa
 de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de
 Ciências da Saúde) Universidade de Brasília, 2025.

 1. Resistência bacteriana. 2. Extratos de plantas. 3.
 Cerrado brasileiro. 4. Atividade antimicrobiana. 5.
 Sinergismo. I. Vendruscolo Dalmolin , Tanise , orient. II.
 Título.

REBECA SIQUEIRA RUBENS

SINERGISMO ENTRE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO E
POLIMIXINA B: ALTERNATIVA TERAPÊUTICA FRENTE À RESISTÊNCIA
BACTERIANA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 11 de agosto de 2025.

Banca Examinadora

Profª Drª Tanise Vendruscolo Dalmolin - UnB

Bruna Fuga Araújo- UnB

Juliana Caierão - UFRGS

RESUMO

O crescente número de infecções causadas por bactérias multirresistentes tem se tornado um desafio global, impulsionado pelo uso indiscriminado de antimicrobianos. Diante do aumento da resistência e da falta de descobertas de novos antimicrobianos, a utilização de extratos de plantas como uma alternativa para o combate a infecções causadas por bactérias multirresistentes é bastante promissora. Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana e o potencial sinérgico *in vitro* dos extratos de plantas do cerrado brasileiro *Miconia chamissois*, *Pouteria torta* e *Psidium guajava* frente às cepas referências e isolados clínicos multirresistentes, bem como o sinergismo desses extratos e polimixina B frente à isolados clínicos multirresistentes. Para a avaliação do sinergismo foi utilizado o método Checkerboard ou tabuleiro de xadrez, o qual consiste na combinação de dois compostos com atividade antimicrobiana em diferentes concentrações em placas de 96 poços estéreis. A partir dessa técnica é determinado o índice de combinação fracional e a análise da interação entre os compostos (sinergismo, adição, indiferença ou antagonismo). A combinação entre os extratos apresentou sinergismo frente às cepas de referência, bem como para os isolados clínicos multirresistentes. Além disso, os resultados revelaram sinergismo entre algumas combinações de extratos de plantas e polimixina B com destaque para os resultados do isolado *K. pneumoniae* (6P) que apresentou efeito sinérgico quando combinado à polimixina B em todos os extratos de plantas. Através da combinação de dois compostos, houve redução drástica na concentração inibitória mínima da polimixina B de 125-250µg/mL para 0,24-0,98µg/mL, demonstrando que a bactéria classificada previamente como resistente à polimixina B, com a combinação de extratos de plantas, tornou-se sensível ao antimicrobiano. Nossos achados reforçam o potencial dos extratos de plantas como adjuvantes em terapias antimicrobianas, oferecendo uma alternativa promissora e de baixo custo.

Palavras-Chave: Resistência bacteriana. Extratos de plantas. Cerrado brasileiro. Atividade antimicrobiana. Sinergismo. Polimixina B.

ABSTRACT

The increasing number of infections caused by multidrug-resistant bacteria has become a global challenge, driven by the indiscriminate use of antimicrobials. Considering rising resistance and the lack of new antimicrobial discoveries, the use of plant extracts as an alternative to combat infections caused by multidrug-resistant bacteria is highly promising. This study evaluated the in vitro antimicrobial activity and synergistic potential of plant extracts from the Brazilian cerrado—*Miconia chamissois*, *Pouteria torta*, and *Psidium guajava*—against reference strains and multidrug-resistant clinical isolates, as well as the synergism between these extracts and polymyxin B against multidrug-resistant clinical isolates.

To assess synergism, the Checkerboard method was used, which involves combining two compounds with antimicrobial activity at different concentrations in sterile 96-well plates. This technique determines the fractional inhibitory concentration index and analyzes the interaction between compounds (synergism, addition, indifference, or antagonism). The combination of extracts showed synergism against reference strains as well as multidrug-resistant clinical isolates. Furthermore, the results revealed synergism between some combinations of plant extracts and polymyxin B, with notable results for the *K. pneumoniae* isolate (6P), which exhibited a synergistic effect when combined with polymyxin B in all plant extracts. Through the combination of two compounds, there was a drastic reduction in the minimum inhibitory concentration of polymyxin B from 125–250 µg/mL to 0.24–0.98 µg/mL, demonstrating that the bacterium previously classified as resistant to polymyxin B became sensitive to the antimicrobial when combined with plant extracts. Our findings reinforce the potential of plant extracts as adjuvants in antimicrobial therapies, offering a promising and low-cost alternative.

Keywords: Bacterial resistance, plant extracts, Brazilian cerrado, antimicrobial activity, synergy, checkerboard, polymyxin B.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo à minha família, que esteve ao meu lado desde o início dessa longa jornada, uma trajetória que começou muito antes deste trabalho, lá em 2018, no dia em que ingressei na Universidade de Brasília. Sou profundamente grata por ter tido a oportunidade de estudar em uma das maiores universidades públicas do país e por tudo o que essa experiência me proporcionou e me ensinou ao longo dos anos, sem o apoio emocional e financeiro da minha família esse processo teria sido muito mais difícil.

Agradeço, com todo o meu carinho, ao meu noivo Iather, que sempre acreditou em mim e no meu potencial. Nos momentos em que duvidei da minha capacidade, ele esteve presente para me lembrar da minha força, das minhas origens e dos meus sonhos. Obrigada, meu amor, por caminhar firme ao meu lado e me incentivar a seguir em frente com confiança.

Sou imensamente grata aos meus amigos, que me apoiaram nos momentos difíceis e encontraram em mim um exemplo de perseverança. Entre esses amigos, quero destacar Larissa e Isabel, minhas companheiras de mestrado, que compartilharam comigo não só o dia a dia do laboratório, mas também desafios, aprendizados e muitas risadas. Sentirei muita falta desses momentos que vivemos juntas. Agradeço à Milena, por ter me incentivado a começar esse mestrado e por ter me mostrado o mundo de portas abertas que existem no mundo, foi parte essencial nesse processo.

Por fim, deixo meu sincero agradecimento à minha orientadora, Tanise, que desde os tempos do PIBIC acreditou no meu trabalho e confiou em mim. Sou verdadeiramente grata por ter você como orientadora e inspiração. Não poderia ter escolhido alguém melhor para me acompanhar e guiar nesta etapa tão importante da minha trajetória.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	18
Figura 2. Estrutura química colistina (i.) e polimixina B (ii.).	20
Figura 3. Placa com resazurina após 18 horas de incubação + 2 horas de reação.	33
Figura 4. Modelo simplificado da metodologia Checkerboard (tabuleiro de xadrez).	35
Figura 5. Placa de 96 poços após 18 horas de incubação pronta para leitura de OD.	35
Figura 6. Representação de placa de 96 poços de extratos em combinação e suas concentrações.	36
Figura 7. Representação de placa de 96 poços de extratos em combinação com a polimixina B e suas concentrações.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de microrganismos prioritários segundo OMS.....	17
Tabela 2. Isolados clínicos multirresistentes utilizados no estudo de atividade antimicrobiana isolado e em combinação entre os extratos vegetais.	31
Tabela 3. Avaliação da CIM para os extratos sozinhos frente aos isolados bacterianos.	39
Tabela 4. Avaliação do sinergismo entre os extratos M. chamissois, P. torta e P. guajava frente a cepas referência de E. coli e P. aeruginosa e isolados clínicos multirresistentes de Enterobacter spp. (92P), Serratia spp. (54P) e K. pneumoniae (12P).	39
Tabela 5. Avaliação do efeito sinérgico dos extratos M. chamissois, P. torta e P. guajava em combinação com polimixina B frente a isolados clínicos multirresistentes de K. pneumoniae (6P e 12P) e Enterobacter spp (92P).	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	16
3.1 Resistência aos antimicrobianos.....	16
3.2 Carbapenêmicos e as carbapenemases.....	18
3.3 Polimixinas e a resistência	20
3.4 Extratos de plantas sendo utilizados no contexto saúde.....	23
3.5 Extratos do Cerrado brasileiro.....	25
3.5.1 <i>Miconia chamissois</i>	25
3.5.2 <i>Pouteria torta</i>	27
3.5.3 <i>Psidium guajava</i>	28
3.6 Sinergismo entre extratos de plantas e antimicrobianos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Extratos de plantas	30
3.1.1. <i>M. chamissois</i>	30
3.1.2. <i>P. guajava</i>	30
3.1.3 <i>P. torta</i>	31
3.2 Isolados bacterianos	31
3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos isolados	32
3.4 Avaliação do sinergismo através do Método Checkerboard (tabuleiro de xadrez)	34
3.5 Análise dos resultados de leitura de OD	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Avaliação antimicrobiana dos extratos isolados e da polimixina B.....	39
4.2 Avaliação do sinergismo de combinações entre extratos vegetais e antimicrobiano.....	39
5 DISCUSSÃO.....	45
6 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	56

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a resistência aos antimicrobianos (RAM) pode ser considerada como uma das maiores causas de mortalidade em ambiente hospitalar. Estima-se que em 2050, 10 milhões de pacientes, anualmente, poderão vir a óbito em decorrência de bactérias multirresistentes, sendo considerado um problema de saúde pública com elevado custo econômico para as entidades governamentais mundiais (WHO, 2022). A resistência antimicrobiana ocorre quando microrganismos conseguem sobreviver e se multiplicar mesmo após serem expostos a um antimicrobiano que, em condições normais, deveria inibir seu crescimento ou eliminá-los (Morrison; Zembower, 2022).

Segundo estimativas, em 2019 houve 4,95 milhões de mortes causadas por doenças bacterianas resistentes aos antimicrobianos. Iniciativas para aumentar a conscientização pública, melhorar o diagnóstico e vigilância de isolados, uso prudente de antimicrobianos e aumento do financiamento para o desenvolvimento de novos antimicrobianos e vacinas têm sido usadas para combate a RAM. Além disso, a busca por métodos alternativos como fagoterapia, nanotecnologia e uso de extratos de plantas naturais no combate a RAM tornam-se cada vez mais visados pela comunidade científica (Gradinaru *et al.*, 2023; Lancet, 2022; Murray *et al.*, 2022; Skosana *et al.*, 2023; Strathdee *et al.*, 2023).

O desenvolvimento e uso de antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos representou um avanço significativo para a saúde pública global, devido ao seu amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e anaeróbias. Os carbapenêmicos demonstram eficácia no tratamento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes a cefalosporinas de 3ª geração ou produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ES β L) (Paul *et al.*, 2022).

Os carbapenêmicos atuam inibindo a biossíntese da parede celular, impedindo a transpeptidação, um processo essencial para a preservação da integridade da parede celular. Em bactérias Gram-negativas esses compostos necessitam da presença de porinas, como por exemplo a OprD presente em *Pseudomonas aeruginosa* sendo essencial para entrada do antimicrobiano no interior da bactéria. Os carbapenêmicos inibem enzimas da família das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) por meio da acilação de seus sítios-alvo, bloqueando a etapa final da síntese da parede celular. A afinidade dessa classe de antimicrobianos pelas diferentes PBPs varia entre as espécies bacterianas, sendo que as PBPs de bactérias Gram-negativas

apresentam diferenças estruturais em relação às das Gram-positivas. Nas bactérias Gram-positivas, as PBPs estão mais expostas devido à ausência de membrana externa e à presença de uma camada de peptidoglicano, facilitando o acesso do antimicrobiano (Armstrong *et al.*, 2021).

Com o passar do tempo as enterobactérias desenvolveram mecanismos de resistência frente aos carbapenêmicos, principalmente, através de enzimas denominadas carbapenemases que são enzimas β -lactamases capazes de hidrolisar e inativar o anel β -lactâmico dos carbapenêmicos, impedindo sua ligação às PBPs e, portanto, bloqueando seu efeito antibacteriano. A emergência de Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos (ERC) tem sido acompanhada por um aumento no consumo de antimicrobianos como as polimixinas, as quais, devido à sua eficácia contra patógenos multirresistentes, tornou-se uma das poucas opções terapêuticas disponíveis atualmente para infecções causadas por ERCs (Collar *et al.*, 2024; Lee *et al.*, 2022).

Descobertas na década de 1940, as polimixinas pertencem à classe dos polipeptídeos cíclicos não ribossômicos e desenvolvidas através do metabólito secundário da bactéria *Paenibacillus polymyxa*. Embora apresentem eficácia contra bactérias resistentes aos carbapenêmicos, seu uso é limitado devido à elevada toxicidade, sendo a nefrotoxicidade e a neurotoxicidade os principais efeitos adversos associados a esse antimicrobiano (Moubareck, 2020; Rigatto.; Falci; Zavascki, 2019; Yang *et al.*, 2023).

Existe uma variedade de polimixinas (A, B, C, D e E), entretanto somente as polimixinas B e E (colistina) são comumente utilizadas no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos (Paul *et al.*, 2022). As polimixinas interagem com a membrana externa das bactérias Gram-negativas, ligando-se ao lipídio A, componente estrutural da membrana bacteriana, induzindo o deslocamento de cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , da membrana. Posteriormente, as polimixinas inserem suas cadeias lipofílicas na membrana, comprometendo sua integridade e possivelmente formando poros, o que leva à morte celular (Moubareck, 2020).

Apesar desses antimicrobianos serem uma esperança no que diz respeito ao tratamento de bactérias resistentes aos carbapenêmicos, em 2015 a descoberta da resistência às polimixinas mediada pelo *gene mcr* (*mobile colistin resistance*) representou um perigo substancial para a saúde pública. A primeira identificação do

gene *mcr-1* foi na China em isolados de *Escherichia coli* oriundos de amostras de porcos e humanos. A descoberta desse gene foi de grande preocupação, uma vez que a colistina era amplamente utilizada no setor de criação de animais do país. Além disso, foi descoberto que o gene *mcr-1* estava contido em um plasmídeo, fazendo com que esse determinante de resistência fosse transferido facilmente para outras bactérias (Liu *et al.* 2016). Posteriormente foram encontrados novos isolados com a presença do gene *mcr-1* em vários países incluindo Brasil, Portugal e África do Sul, o que demonstrou a expansão do gene no mundo (Coetzee *et al.* 2016; Dalmolin *et al.* 2018; Fernandes *et al.* 2016).

A descoberta e a disseminação desse gene ressaltam a necessidade de uma vigilância global, além da busca por novas estratégias terapêuticas. Nesse cenário, os antimicrobianos naturais têm ganhado destaque na pesquisa científica como alternativas promissoras. Extratos de plantas e outros produtos naturais vêm demonstrando potencial como substitutos viáveis aos antimicrobianos convencionais (Saquib *et al.*, 2021). O Cerrado brasileiro, em particular, se destaca por sua diversidade de espécies vegetais, muitas das quais contêm compostos bioativos de interesse para estudos sobre suas propriedades terapêuticas (Neto; Moraes, 2003).

Miconia chamissois é uma planta nativa do Brasil encontrada no Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica, que possui seus compostos fitoquímicos elucidados com ações terapêuticas para tratar doenças inflamatórias e neurodegenerativas, além de câncer e outras patologias que envolvem radicais livres (Ferreira *et al.*, 2022). *Pouteria torta* é uma planta natural do Cerrado com seus compostos elucidados e sua ação terapêutica conhecida. Em 2000 foi relatado que o extrato metanólico das folhas de *P. torta* apresentou atividade antimicrobiana contra algumas espécies bacterianas (De Almeida Alves *et al.*, 2000). Outro extrato com ação terapêutica muito conhecida no Cerrado é o de *Psidium guajava* (popularmente conhecida como goiabeira) com atividade antioxidante e atividade antibacteriana (Huang *et al.*, 2021; Lok *et al.*, 2023).

Uma alternativa para a RAM é a utilização de extratos de plantas isolados, além da combinação de extratos entre si ou a combinação de extratos com antimicrobianos já disponíveis comercialmente (Langeveld *et al.*, 2014). Os extratos citados anteriormente (*M. chamissois*, *P. torta* e *P. guajava*) contêm metabólitos bioativos que podem influenciar tanto a atividade do antimicrobiano quanto de outro extrato com o qual são combinados. Essa interação pode resultar em diferentes efeitos: como sinérgica, quando os componentes se potencializam; aditiva, quando seus efeitos se somam; antagônica, quando um reduz a atividade antimicrobiana do outro; ou indiferente, quando não há alteração significativa na eficácia combinada em relação ao uso isolado dos agentes (Déciga-Campos *et al.*, 2022). Diante disso, o presente estudo teve como objetivo identificar extratos de plantas com atividade antimicrobiana, os quais poderão indicar potenciais candidatos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos no combate à RAM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e o potencial sinérgico entre extratos de plantas do Cerrado brasileiro (*M. chamissois*, *P. torta* e *P. guajava*) frente a cepas de referência e isolados clínicos multirresistentes, bem como o sinergismo dos extratos e polimixina B frente a isolados clínicos multirresistentes.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade antimicrobiana individual dos extratos frente a cepas de referência e aos isolados clínicos multirresistentes.
- Avaliar o efeito das combinações entre os extratos vegetais frente a cepas de referência e isolados clínicos multirresistentes.
- Avaliar o efeito sinérgico da combinação dos extratos vegetais com a polimixina B.
- Discutir as implicações clínicas dos resultados obtidos, destacando o potencial dessas combinações como terapia adjuvante em infecções por patógenos multirresistentes.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Resistência aos antimicrobianos

Uma das grandes revoluções e avanços da humanidade foi a descoberta por Alexander Fleming, em 1928, da penicilina isolada do fungo do gênero *Penicillium*. Antes da introdução da penicilina como fármaco, muitas doenças infecciosas comuns, como a pneumonia e a septicemia, frequentemente resultavam em desfechos fatais (Fleming, 1946). A introdução da penicilina na prática clínica incentivou o desenvolvimento de pesquisas no campo da antibioticoterapia, levando à descoberta e ao aperfeiçoamento de novos agentes antimicrobianos. Entre as décadas de 1940 e 1960, período conhecido como a "Era de Ouro" da descoberta dos antimicrobianos, diversos compostos foram identificados e utilizados na prática médica (Gonzalez-Zorn *et al.*, 2024).

No entanto, ao longo dos anos, o desenvolvimento de novos antimicrobianos sofreu uma desaceleração significativa, contrastando com o aumento exponencial do seu uso, levando a seleção de bactérias cada vez mais resistentes aos antimicrobianos e aumentando a mortalidade em doenças infecciosas (Aljeldah *et al.*, 2022). Esse cenário tornou-se ainda mais crítico em períodos de crise sanitária, como a pandemia da COVID-19, que levou ao uso intensificado de antimicrobianos, muitas vezes de forma indiscriminada, contribuindo para a disseminação de microrganismos resistentes e representando um desafio crescente para a saúde pública global (Langford *et al.*, 2023).

Em 2024 a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista global de microrganismos de prioridade crítica que causam risco à saúde humana, dentre eles *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos, Enterobacterales resistentes às cefalosporinas de terceira geração e resistentes aos carbapenêmicos e *Mycobacterium tuberculosis* resistente à rifampicina. Essa lista foi desenvolvida para ajudar a direcionar esforços e recursos no combate à RAM e servir como orientação na pesquisa e no desenvolvimento de novos antimicrobianos, levando em conta as necessidades específicas de cada região do mundo (WHO, 2024) (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de microrganismos prioritários segundo OMS.

PRIORIDADE CRÍTICA	PRIORIDADE ALTA	PRIORIDADE MÉDIA
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos.	<i>Salmonella</i> Typhi resistente à fluoroquinolona.	Estreptococos do grupo A resistentes aos macrolídeos.
Enterobacterales resistente à cefalosporinas de terceira geração.	<i>Shigella</i> spp. resistente à fluoroquinolonas.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente aos macrolídeos.
Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos.	<i>Enterococcus faecium</i> resistente à vancomicina.	<i>Haemophilus influenzae</i> resistente à ampicilina.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistente à rifampicina.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos.	Estreptococos do grupo B resistentes aos macrolídeos.
	<i>Salmonella</i> não tifoide resistente à fluoroquinolonas.	
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente à cefalosporinas de terceira geração e/ou fluoroquinolonas.	
	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina.	

De acordo com O'Neill (2016), dados de 2016 já apontavam um cenário alarmante: mais de 700 mil pessoas morriam anualmente devido a infecções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos. A projeção para o futuro é ainda mais preocupante, se nenhuma ação efetiva for adotada para conter esse avanço, sendo que o número de mortes poderá atingir a marca de 10 milhões por ano até 2050, gerando impacto tanto na saúde quanto na economia mundial. Essa estimativa reforça a importância de implementar estratégias de prevenção e controle da resistência, além do desenvolvimento de alternativas terapêuticas (O'Neill, 2016).

Os mecanismos envolvidos na RAM podem atuar isoladamente ou combinados, conferindo às bactérias a capacidade de sobreviver a ação dos antimicrobianos. Dentre os principais mecanismos descritos na literatura, destaca-se a hidrólise, na qual as bactérias produzem enzimas capazes de degradar o antimicrobiano antes que ele exerça seu efeito, como ocorre com as β -lactamases. Outro mecanismo relevante é o aumento da expressão de bombas de efluxo, que promovem a expulsão do antimicrobiano do meio intracelular bacteriano. A alteração do alvo é um processo no qual o microrganismo modifica estruturas essenciais, como proteínas ou ribossomos, impedindo a ligação do antimicrobiano e inativando sua ação. Além disso, modificações químicas promovidas por enzimas, como fosforilação,

acetilação e nucleotidilação, alteram a estrutura do antimicrobiano, dificultando sua interação com o alvo bacteriano (Aljeldah *et al.*, 2022; Baran *et al.*, 2023).

Além dos mecanismos já citados, a perda ou modificação de porinas também desempenha um papel importante na resistência aos antimicrobianos. As porinas são proteínas de membrana externa, especialmente encontradas em bactérias Gram-negativas, que formam canais responsáveis pelo transporte de moléculas hidrofílicas, incluindo antimicrobianos, para o interior da célula bacteriana. A diminuição da expressão ou alterações estruturais dessas porinas pode reduzir significativamente a entrada dos antimicrobianos, especialmente dos β -lactâmicos, diminuindo sua concentração intracelular e, conseqüentemente, sua eficácia. Esse mecanismo é frequentemente observado em conjunto com a produção de β -lactamases, potencializando a RAM (Abushaheen *et al.*, 2023; Chiş *et al.*, 2022) (Figura 1).

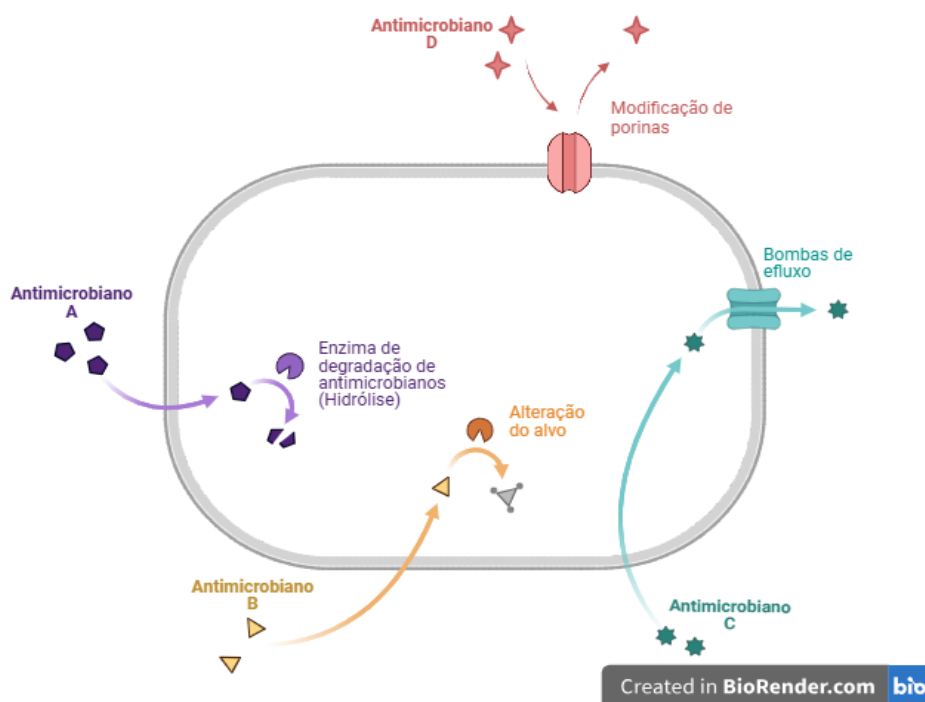


Figura 1. Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

3.2 Carbapenêmicos e as carbapenemases

Durante certo tempo, os carbapenêmicos foram primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias com ES β L. No entanto, isso tem mudado devido ao surgimento de bactérias produtoras de carbapenemases (Husna *et al.*, 2023). As carbapenemases são enzimas β -lactamases que podem hidrolisar os carbapenêmicos, bem como a maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos (Poirel,

2014). Ademais, bactérias produtoras de carbapenemases apresentam localização de genes codificadores em estruturas móveis (transposons e plasmídeos), em sua maioria facilmente transferíveis para outras espécies de bactérias que já desenvolveram resistência a outras classes de antimicrobianos, podendo levar a multirresistência (Nordmann; Poirel 2014).

As carbapenemases são classificadas em três classes moleculares (A, B e D), segundo Ambler. As enzimas das classes A e D pertencem às serino- β -lactamases, que apresentam resíduo de serina nos seus sítios ativos. Enzimas da classe B são pertencentes ao grupo das metalo- β -lactamases (M β L), as quais necessitam de íons de zinco para atividade hidrolítica. Portanto, MBL podem ser inibidas na presença de agentes quelantes (García-Betancur *et al.*, 2021). Atualmente, as enzimas mais relevantes em termos de difusão global e impacto clínico em ERC são *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) pertencente à classe A; New Delhi metallo- β -lactamase (NDM), Verona metallo- β -lactamase (VIM), Imipenemase (IMP) pertencentes à classe B; e Oxacillinase-48-like carbapenemase (OXA-48-like) pertencente à classe D (Alvisi *et al.*, 2025).

A prevalência e padrões de resistência variam mundialmente, de acordo com a região. Essa variação dificulta a padronização de diretrizes de tratamento e destaca a necessidade de vigilância localizada e estratégias de resposta (Han *et al.*, 2020).

A KPC é a enzima mais prevalente no Brasil e foi identificada pela primeira vez em 2008. Desde sua descoberta essa enzima vem sendo identificada em diferentes espécies evidenciando alta transmissibilidade do gene (Monteiro *et al.*, 2008; Tsioutis; Eichel; Mutters, 2021). Atualmente, mais de 200 variantes de KPC já foram identificadas mundialmente, sendo a variante KPC-2 e KPC-3 as mais prevalentes mundialmente (Sun *et al.*, 2025). A transmissão desse gene pode ocorrer por alguns mecanismos, sendo eles a mobilidade de pequenos elementos genéticos como transposons *Tn4401*, a transferência horizontal de plasmídeos e a disseminação clonal (Huang *et al.*, 2022).

A carbapenemase NDM foi identificada pela primeira vez em 2008, na cidade de New Delhi, na Índia, em uma amostra de urina de um paciente sueco (Yong *et al.*, 2009). No Brasil, essa carbapenemase foi identificada pela primeira vez em Porto Alegre, Rio Grande do Sul (Carvalho-Assef *et al.*, 2013). A enzima NDM é capaz de hidrolisar uma ampla variedade de β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos (Bose; Rangnekar; Desikan, 2022).

3.3 Polimixinas e a resistência

Atualmente, as polimixinas representam uma das últimas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos. Dentre as polimixinas existentes, destacam-se a colistina (polimixina E) e a polimixina B, antimicrobianos polipeptídicos catiônicos. Sua estrutura básica é composta por uma cadeia lateral de ácido graxo ligada a um anel peptídico policatiônico formado por aminoácidos. A principal diferença estrutural entre a polimixina B e a colistina reside na substituição de um único aminoácido na posição 6 no anel peptídico: fenilalanina na polimixina B e leucina na colistina (Zou *et al.*, 2021) (Figura 2).

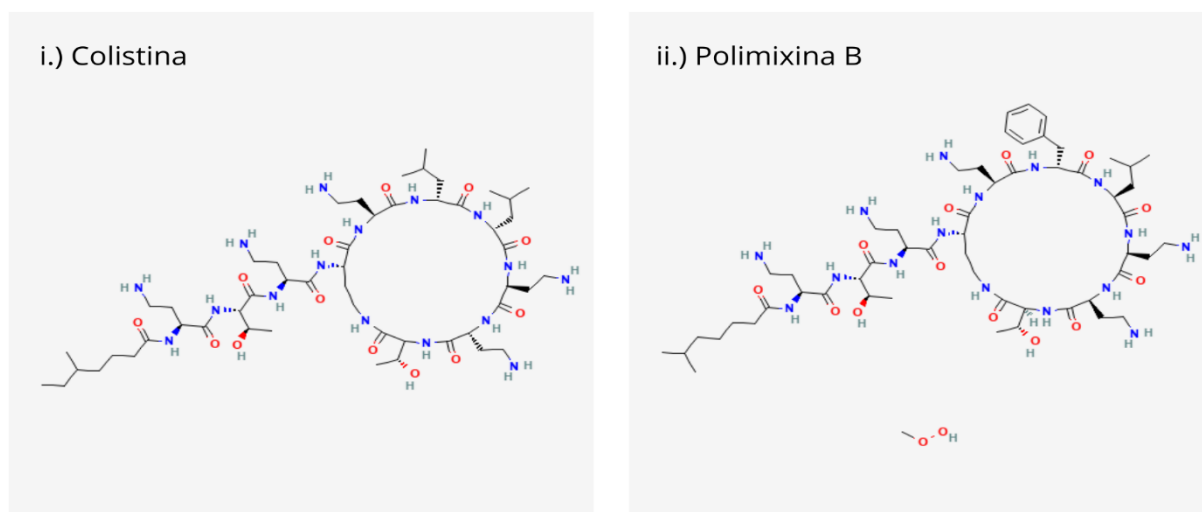


Figura 2. Estrutura química colistina (i.) e polimixina B (ii.).

Fonte: PubChem. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Além da estrutura química, a maneira que os antimicrobianos são utilizados clinicamente também diferem. A colistina é utilizada como um pró-fármaco inativo, denominado metanossulfonato de colistina, também conhecido como colistimetato sódico (CMS). Esse pró-fármaco apresenta menor toxicidade em comparação à forma ativa (sulfato de colistina) e, após a administração, é convertido em meio aquoso e nos fluidos biológicos do organismo em colistina ativa e em diversos compostos metanossulfonados inativos. O fármaco possui uma janela terapêutica estreita e, quando administrada por via parenteral, seus principais efeitos adversos são a neurotoxicidade e a nefrotoxicidade (Aysert-Yildiz *et al.*, 2024).

Devido ao seu potencial nefrotóxico, o uso das polimixinas em seres humanos foi significativamente reduzido a partir da década de 1970. A aplicação clínica passou a ser restrita a situações específicas, como em preparações oftálmicas e tópicas, no uso sistêmico ou por nebulização em pacientes com fibrose cística, além de ser empregada na descontaminação do trato digestivo e da orofaringe. Em contraste, seu uso em animais foi amplamente disseminado por décadas, tanto no tratamento quanto, principalmente, na prevenção de infecções causadas por enterobactérias em aves e suínos, além de ser utilizado como promotor de crescimento desses animais (Rodríguez-Santiago *et al.*, 2021).

Atualmente sabemos que o uso excessivo de antimicrobianos na agropecuária trouxe consequências à saúde animal e humana, como a presença do gene de resistência às polimixinas *mcr-1*. Um estudo conduzido por Shen e colaboradores (2021) avaliou os efeitos positivos da proibição do uso da colistina na alimentação animal, medida implementada na China em 2017. Entre os principais resultados, observou-se a redução significativa na prevalência do gene *mcr-1* em granjas de suínos de 45% em 2016 para 19% em 2018 (Shen *et al.*, 2021). Esses dados reforçam a importância da abordagem *One Health* no enfrentamento da RAM e evidenciam como o uso indiscriminado da colistina na produção animal pode ter contribuído para a disseminação global da resistência. O conceito de *One Health* se fundamenta na interdependência da saúde humana, animal e do meio ambiente, reconhecendo que a promoção da saúde e o controle de doenças devem ser abordados de forma integrada e multidisciplinar (Aslam *et al.*, 2021).

Apesar de ser uma grande aliada no combate de infecções causadas por bactérias resistentes aos carbapenêmicos, atualmente os microrganismos possuem diversos mecanismos para adquirir resistência às polimixinas como modificação da membrana externa, alterações no lipídio A e o uso de bombas de efluxo (Shahzad; Willcox; Rayamajhee, 2023).

Um dos principais mecanismos de defesa das bactérias frente às polimixinas é a alteração no lipossacarídeo (LPS) da membrana externa de bactérias Gram-negativas, onde é reduzida a carga negativa da membrana, dificultando a ligação do antimicrobiano à parede celular. Essa alteração pode acontecer quando há uma substituição dos grupos fosfato do lipídio A por grupos catiônicos 4-amino-4-deoxi-Larabinose (L-Ara4N) e/ou fosfoetanolamina (PEtN). O que pode ocorrer é uma mutação nos sistemas reguladores levando à regulação positiva, que é acompanhada

pela adição de mais porções catiônicas ao LPS, o que, por sua vez, diminui a carga negativa líquida da membrana externa e impede a ação das polimixinas (Ahmed *et al.*, 2020).

Portanto, a resistência intrínseca (atualmente denominada fenótipo esperado resistente) às polimixinas é atribuída, em grande parte, à expressão de genes que promovem a modificação do LPS por meio da adição de grupos catiônicos. Essa alteração reduz a afinidade das polimixinas por seu alvo na membrana externa, comprometendo sua atividade antimicrobiana. No caso das bactérias Gram-positivas, a ausência da membrana externa contendo LPS explica a resistência natural, uma vez que o principal sítio de ação das polimixinas está ausente, impedindo sua ligação e efeito bactericida (Lepe *et al.*, 2022).

Antes da descoberta do gene *mcr-1*, acreditava-se que os mecanismos de resistência às polimixinas eram exclusivamente decorrentes de mutações cromossômicas que promoviam modificações no lipídeo A, por meio da adição de grupos catiônicos de forma semelhante ao observado nos mecanismos de resistência intrínseca existente nas Gram-positivas. Diversas vias genéticas estão implicadas nesse processo como mutações em genes diretamente envolvidos na biossíntese e incorporação de grupos catiônicos ao LPS, como *pmrC*, *pmrE* e o operon *pmrHFIJKLM*; alterações nos sistemas regulatórios de dois componentes, como o sistema PmrAB, presente em *K. pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes* e *Salmonella* spp. (*pmrA* e *pmrB*), e o sistema PhoPQ, descrito em *K. pneumoniae* e *E. coli* (*phoP* e *phoQ*); e mutações em genes moduladores, como *mgrB*, que atua na regulação negativa do sistema PhoPQ em *Klebsiella* spp. (Lepe *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2020).

A identificação do gene *mcr-1*, em novembro de 2015 por Liu e colaboradores, marcou uma mudança no entendimento da resistência às polimixinas. Pela primeira vez, foi descrita uma forma de resistência às polimixinas mediada por plasmídeos, identificada em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* provenientes de humanos e animais na China. Essa descoberta trouxe grande preocupação à saúde pública, pois revelou a possibilidade de disseminação horizontal da resistência, por meio da transferência entre diferentes espécies bacterianas. A proteína MCR-1 pertence à família das fosfoetanolamina transferases e sua expressão leva à modificação do lipídeo A pela adição de uma molécula de PEtN, o que reduz a afinidade das polimixinas pela membrana externa e confere resistência, de forma semelhante ao mecanismo observado nas mutações cromossômicas (Liu *et al.*, 2016).

Diversas variantes do gene *mcr* foram identificadas. Gene *mcr-2* foi detectada na Bélgica, em isolados de *E. coli* de suínos e bezerros, apresentando aproximadamente 80% de identidade com *mcr-1* (Xavier *et al.*, 2016). Em 2017, a variante *mcr-3* foi descrita em *E. coli* isoladas de porcos (Yin *et al.*, 2017), e, no mesmo período, o gene *mcr-4* foi detectada em isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp. obtidos na Bélgica, Espanha e Itália (Carattoli *et al.*, 2017). Novas variantes continuaram sendo descritas, como *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7* e *mcr-8*. Dentre essas, destaca-se o gene *mcr-5*, identificado em um transposon integrado ao cromossomo bacteriano, o que pode contribuir para sua maior estabilidade genética e potencial disseminação (AbuOun *et al.*, 2017; Borowiak *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018).

Em 2019, a variante *mcr-9* foi identificada em um isolado de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, proveniente de um paciente nos Estados Unidos, com amostra datada de 2010 (Carroll *et al.*, 2019). Até o momento, a variante *mcr-10* é a mais recentemente descrita, tendo sido detectada em um isolado de *Enterobacter roggenkampii* na China (Wang *et al.*, 2020). O padrão de disseminação e a frequência dessas variantes variam geograficamente e entre espécies bacterianas. Segundo análises baseadas em dados já publicados, as variantes *mcr-1* e *mcr-9* são atualmente as mais prevalentes globalmente (Ling *et al.*, 2020).

3.4 Extratos de plantas sendo utilizados no contexto saúde

Segundo a Farmacopeia Brasileira (7ª edição, Volume I) um extrato de planta é definido como um produto preparado a partir de droga vegetal por meio de um solvente adequado, que pode ser posteriormente eliminado total ou parcialmente, resultando em uma preparação líquida, mole ou sólida, contendo os constituintes ativos ou marcadores da planta em concentração determinada (Brasil, 2024).

O uso e investigação de plantas com propriedades terapêuticas está presente desde o início das civilizações. Há relatos de que o uso desse tipo de “terapia natural” já era utilizado desde os primórdios do que conhecemos como sociedade (Amanpour *et al.*, 2023). Com a chegada dos colonizadores europeus ao território que hoje compreende o Brasil, foram identificadas práticas terapêuticas profundamente distintas das ocidentais, desenvolvidas pelos povos indígenas locais. Esses grupos faziam uso de recursos vegetais nativos de maneira integrada a concepções que saíam do âmbito terapêutico, incorporando elementos espirituais e metafísicos aos seus processos de cura (Castro; Figueiredo, 2019).

Diferente do Brasil e outros países como Índia, China e Egito, nos países da Europa, a prática médica era fundamentada em uma abordagem racional e sistemática, baseada na observação empírica, na elaboração de diagnósticos precisos e na formulação de tratamentos derivados de investigações científicas, fazendo com que o uso de plantas medicinais fosse visto como “ultrapassado” ou inadequado quando comparado com o uso da medicina europeia (Pedroso; Andrade; Pires, 2021).

Entretanto, mesmo com o avanço tecnológico e o aumento de medicamentos sintéticos após a revolução industrial, populações mais pobres de países em desenvolvimento ainda possuem dificuldade de acesso a esses fármacos, fazendo com que o uso das terapias naturais fosse parte do costume e cultura da população. A probabilidade de se identificar atividades biológicas em plantas é significativamente maior quando sua seleção se baseia no uso tradicional na medicina popular, em comparação à escolha aleatória (Rocha *et al.*, 2021).

A partir da década de 70, o uso de plantas medicinais começou a ser discutido e valorizado em conferências internacionais, o que levou a movimentos em prol da reforma sanitária no Brasil. É importante diferenciar que plantas medicinais são as espécies vegetais utilizadas diretamente para fins terapêuticos, enquanto a fitoterapia se refere ao uso científico e racional desses vegetais ou seus extratos na prevenção e tratamento de doenças, com controle de qualidade e evidência de eficácia. O uso racional desses compostos se tornou prioridade no que diz respeito a saúde pública no Brasil, sendo que o governo brasileiro implementou políticas voltadas à promoção da fitoterapia, incorporando práticas integrativas ao sistema oficial de saúde (Castro; Figueiredo, 2019).

A criação do Sistema Único de Saúde (SUS) e da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PNPICS) representou um marco na articulação entre saberes da medicina tradicional e abordagens da medicina alternativa (Castro; Figueiredo, 2019). Nesse contexto, o uso de drogas vegetais passou a ser regulamentado no âmbito do SUS, permitindo a utilização terapêutica de partes específicas de plantas, como folhas, cascas, raízes e flores, sendo utilizadas como alternativas aos tratamentos convencionais (Rocha *et al.*, 2021).

No Brasil, o interesse pela fitoterapia e uso de extratos, óleos ou partes de plantas cresceu nos últimos anos. Observa-se um aumento significativo nas pesquisas envolvendo plantas medicinais, impulsionado tanto pela ampla biodiversidade

presente nos diferentes biomas do país quanto pela variedade de metabólitos secundários produzidos por essas espécies, os quais despertam crescente interesse científico e tecnológico. Esses estudos têm contribuído para a geração de conhecimentos científicos relevantes na área com plantas de biomas locais (Malara *et al.*, 2021).

Um composto vegetal como um extrato, pode possuir diversos metabólitos oriundos do metabolismo secundário de uma planta, os quais serão o princípio ativo dessa planta utilizada. Os terpenoides representam a classe mais diversificada de metabólitos secundários, com aproximadamente 55 mil compostos já identificados, amplamente distribuídos entre as espécies vegetais. Sua estrutura é derivada da união de unidades isoprênicas contendo cinco átomos de carbono (C5). A classificação desses compostos baseia-se no número de unidades C5 presentes em sua constituição, sendo categorizados como monoterpenos (duas unidades C5), sesquiterpenos (três unidades C5), diterpenos (quatro unidades C5) e triterpenos (seis unidades C5) (De Sousa *et al.*, 2023).

Diante dessa situação, esses extratos de plantas despertam interesses comerciais tanto na indústria alimentícia quanto farmacêutica, uma vez que esses compostos podem ser isolados e utilizados para diversos fins terapêuticos (Castro; Figueiredo, 2019).

3.5 Extratos do Cerrado brasileiro

O Cerrado brasileiro, considerado o segundo maior bioma da América do Sul, destaca-se por sua notável diversidade biológica. Reconhecido como a savana mais rica do mundo em termos de biodiversidade, abriga 11627 espécies de plantas nativas já registradas, das quais mais de 220 apresentam usos medicinais conhecidos (Brasil, 2025). Tornando-se um local de interesse para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos através do uso de plantas e seus compostos.

3.5.1 *Miconia chamissois*

Dentre os diversos extratos e compostos presentes no cerrado brasileiro a *M. chamissois* popularmente conhecida como “pixirica-açu” ou “folha-de-bolo” se destaca tanto pelo seu uso na cultura como na medicina. É uma espécie arbustiva ou arbórea de pequeno porte, podendo atingir até 4,5 metros de altura. Sua distribuição geográfica compreende regiões da Bolívia e do Brasil, tendo sido registrada também nos biomas Amazônia, Caatinga e Cerrado, especialmente em ambientes úmidos e

áreas alagadiças. Suas folhas são coriáceas, com formato oval a elíptico, coloração marrom-avermelhada na fase juvenil, e lâminas foliares medindo entre 17-23 cm de comprimento por 5-10 cm de largura. As flores apresentam coloração branca, enquanto os frutos são bagas com tonalidades que variam do vermelho ao roxo (Silva, 2023).

Pertencente à família Melastomataceae, essa planta apresenta uma composição fitoquímica diversificada, incluindo antraquinonas, flavonoides, triterpenoides, saponinas, taninos e ácidos orgânicos. A presença desses metabólitos secundários está associada a uma ampla gama de potenciais atividades terapêuticas, tais como propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e citotóxicas (Gomes *et al.*, 2021; Menezes Filho *et al.*, 2022).

Estudo realizado por Menezes Filho e colaboradores (2022) qualificou a composição fitoquímica, parâmetros físico-químicos e atividades biológicas do extrato etanólico de *M. chamissois*. Os resultados indicam que *M. chamissois* é uma espécie promissora para compostos biologicamente ativos, exibindo várias propriedades benéficas, dentre elas fotoproteção, atividade antioxidante e antimicrobiana. O extrato exibiu atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*, além de atividade antifúngica contra *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Candida albicans* (Menezes Filho *et al.*, 2022).

A pesquisa realizada por Gomes *et al.* (2021) identificou um alto teor de polifenóis em *M. chamissois*, o que contribui para a atividade antioxidante. Além disso, os resultados corroboram com os achados de Menezes Filho *et al.* (2022), ao demonstrarem atividade antimicrobiana contra *C. albicans* e *S. aureus*. A concentração inibitória mínima (CIM) observada foi de 78,1µg/mL para *C. albicans* e de 312,5µg/mL para *S. aureus* (Gomes *et al.*, 2021).

A capacidade antimicrobiana demonstrada pelo extrato de *M. chamissois* está relacionada à sua composição de metabólitos secundários, especialmente flavonoides de reconhecida atividade biológica (De Sousa *et al.*, 2023). Dentre esses compostos, destacam-se a rutina e a isoquercitrina, cuja ação vai além do efeito antimicrobiano, incluindo a inibição de enzimas como tirosinase e alfa-amilase, associadas a processos inflamatórios e metabólicos. Além disso, a vitexina, outro flavonoide amplamente documentado, foi identificada como um dos principais marcadores químicos nos extratos de *Miconia*, indicando sua relevância não apenas no controle microbiano, mas também em potenciais aplicações antioxidantes, antidiabéticas e

anti-inflamatórias. Esses resultados evidenciam o potencial terapêutico multifuncional de *M. chamissois*, reforçando seu valor como fonte promissora de compostos bioativos para o desenvolvimento de fitoterápicos e produtos farmacêuticos (Menezes Filho *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2023).

3.5.2 *Pouteria torta*

P. torta é uma espécie arbórea típica do bioma do Cerrado, popularmente conhecida como “guapeva”. Seus frutos, ricos em vitaminas e compostos antioxidantes, são tradicionalmente utilizados de forma terapêutica como antidiarreicos. Além disso, várias plantas do gênero *Pouteria* têm demonstrado suas atividades antimicrobianas e antifúngicas, confirmando seu potencial terapêutico (Oliveira *et al.*, 2023). Um estudo conduzido por Sales e colaboradores em 2017 avaliou a capacidade de inibição de α -amilase, que pode ser benéfico no controle do diabetes tipo 2, controlando os níveis de glicose no sangue pós-prandial. Como resultado o extrato bruto de epicarpo de *P. torta* demonstrou atividade inibitória significativa da α -amilase (inibição de 92%), além de identificar seu potencial antioxidante (Sales *et al.*, 2017).

A atividade antioxidante de *P. torta* é principalmente atribuída à presença de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonoides, enquanto sua ação antimicrobiana está associada a polifenóis e terpenoides. A eficácia e o espectro dessa atividade dependem da presença e concentração específicas desses compostos (Fitriansyah; Fidrianny; Hartat, 2020). Estudo realizado por Elias e colaboradores indica que *P. torta* possui substâncias com potencial anticancerígeno, particularmente contra câncer oral e de mama. Essas substâncias foram testadas através de diferentes maneiras de extração do extrato da folha de *P. torta* e testadas na concentração de 500mg/mL, avaliando as linhagens celulares OSCC-3 (modelo de câncer bucal) e MCF-7 (linhagem de câncer de mama humano). Todos os extratos apresentaram efeito citotóxico sobre ambas as linhagens (Elias *et al.*, 2013). Além disso, o extrato de *P. torta* apresentou atividade antifúngica significativa em um estudo com disco-difusão frente a cepas de *Candida* spp. ATCC (Correia *et al.*, 2016). De acordo com o estudo de Santos *et al.* (2015), espécies do mesmo gênero apresentaram um desempenho no combate a bactérias tanto Gram-positivas, como *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *S. pneumoniae*, quanto Gram-negativas, como *P. aeruginosa*. As CIMs variaram entre 250 e 1000 μ g/mL, indicando potencial antimicrobiano (Santos *et al.*, 2015).

3.5.3 *Psidium guajava*

P. guajava, é popularmente conhecida como goiabeira, pertencente à família Myrtaceae, muito comum no Cerrado brasileiro e em regiões tropicais e subtropicais, amplamente cultivada no mundo por seus frutos. É uma planta que cresce até 6 metros de altura, porém ramifica-se perto do solo. Suas folhas são ovais e soltam aroma quando esmagadas (Lok *et al.*, 2023).

As folhas da *P. guajava* são utilizadas como antisséptico para pele e feridas, e possuem propriedades anti-inflamatórias. Em alguns países como Japão, tem sido popularizado seu uso na forma de chás como um aliado na saúde e bem-estar. Além disso, um estudo anterior realizado por Hall *et al.*, 2021 demonstrou que os extratos aquosos e alcoólicos das folhas de *P. guajava* apresentaram atividade antimicrobiana contra alguns patógenos de origem alimentar, como *S. aureus*, *Salmonella* Enteritidis, *E. coli*, *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (Hall *et al.*, 2023).

Sua composição química natural abrange flavonoides, taninos pirogálicos, saponinas e triterpenoides. Huang e colaboradores (2021) isolaram e caracterizaram sete compostos não descritos anteriormente em outros estudos, destacando a diversidade química e o potencial biológico dessa planta. Dentre os compostos isolados e analisados a psidinona demonstrou atividade antibacteriana significativa frente à *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Mycobacterium smegmatis* (Huang *et al.*, 2021).

3.6 Sinergismo entre extratos de plantas e antimicrobianos

De forma geral, considera-se sinergismo quando a combinação de dois compostos produz um efeito superior à soma dos efeitos individuais. Um efeito aditivo ocorre quando a combinação gera exatamente o mesmo efeito que a soma dos compostos isolados um fenômeno que, em alguns casos, também pode ser interpretado como indiferença. Já o antagonismo é observado quando a ação combinada dos extratos resulta em uma atividade inferior àquela apresentada individualmente (Langeveld *et al.*, 2014).

A combinação de extratos gerando o efeito sinérgico pode ser um grande aliado na busca por novas terapias antimicrobianas. Archana e colaboradores (2021) realizaram um estudo para avaliar a utilização de recursos vegetais como tratamento de feridas. Dentre as três plantas estudadas *Cassia fistula*, *Tecoma stans* e *Manilkara zapota*, todas apresentaram maior zona de inibição para os microrganismos *S. aureus* e *Aspergillus niger* quando utilizados extratos em combinação com outros extratos vegetais. As formulações poli herbáceas se mostraram mais eficazes do que os

extratos herbais individuais, apresentando propriedades antifúngicas e antimicrobianas (Archana *et al.*, 2021).

A estrutura química e os constituintes dos extratos podem influenciar o efeito sinérgico das combinações, assim como variações nas concentrações podem resultar em diferentes ações terapêuticas (Sharma *et al.*, 2020). Nesse contexto, o método *checkerboard* ou tabuleiro de xadrez, se mostra uma abordagem eficaz para a avaliação de combinações de extratos, pois permite testar diversas associações em diferentes concentrações, possibilitando a análise da atuação conjunta ou isolada dos compostos, além da determinação da CIM de cada um, individualmente ou em combinação (Bellio *et al.*, 2021).

O uso de medicamentos fitoterápicos e extratos de plantas aumentou significativamente após a pandemia de COVID-19. Estudos recentes pré-clínicos têm demonstrado que a interação de extratos de plantas com antimicrobianos convencionais podem ser uma estratégia no combate a RAMs. Esses extratos possuem muitos compostos bioativos e metabólitos que em combinação a um antimicrobiano pode desencadear um efeito sinérgico e contribuir para diminuir a CIM necessária para o combate do microrganismo (Déciga-Campos *et al.*, 2022).

Um estudo realizado por Ramata-Stunda e colaboradores (2022) abordou o uso de extratos em combinação com antimicrobianos tradicionais para uso clínico no tratamento de infecções respiratórias. Utilizaram o extrato da casca de *Tabebuia avellanedae* e de folhas de *Olea europaea*, os quais mostraram atividade sinérgica com azitromicina e claritromicina frente à *S. aureus*. O efeito sinérgico também foi observado com claritromicina contra *K. pneumoniae* e com os antimicrobianos azitromicina, claritromicina e amoxicilina-clavulanato contra *Haemophilus influenzae*. Esses achados destacam o potencial desses extratos naturais para combater resistência aos antimicrobianos e aumentar a eficácia terapêutica (Ramata-Stunda *et al.*, 2022).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extratos de plantas

Os extratos vegetais utilizados neste estudo foram obtidos a partir das plantas *M. chamissois*, *P. torta* e *P. guajava*. A extração foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (LAPRONAT-FS/UnB).

3.1.1. *M. chamissois*

Folhas íntegras e saudáveis de *M. chamissois* (aproximadamente 5kg) foram selecionadas e submetidas à secagem mista: temperatura ambiente por 30 horas e em estufa com circulação de ar à $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 5 horas. Após a secagem, obteve-se 2,308kg de material seco que foi pulverizado em moinho de facas e padronizado em granulometria de 30 mesh (0,59mm). A droga vegetal foi armazenada em frascos opacos, protegidos da luz, calor e umidade.

A extração foi realizada em sete lotes, na proporção de 1:10 (100g de droga vegetal para 1L de água destilada). A água foi aquecida até a ebulição, resfriada até 70°C e vertida sobre o pó vegetal com agitação mecânica. Quando a temperatura da infusão atingiu 50°C , a solução foi filtrada. Alíquotas foram reservadas para análise de sólidos totais e o restante foi armazenado a -20°C para posterior liofilização. A liofilização foi conduzida a -70°C e 15 mTorr no equipamento VirTis SP Scientific Advantage Plus XL-70. Os extratos secos foram armazenados a -20°C .

3.1.2. *P. guajava*

As folhas de *P. guajava* foram selecionadas e submetidas à secagem combinada, alternando estufa a 37°C e secagem natural, até atingirem teor de umidade entre 8% e 14%. A umidade foi determinada em triplicata por perda por dessecação, com uso de analisador por infravermelho (Gehaka IV2000). O material seco foi pulverizado em moinho de facas (Marconi MA-580®) com peneira de mesh 30, e armazenado em frascos de vidro protegidos da luz, à temperatura ambiente.

Quatro lotes foram preparados por infusão, na proporção de 1:10 (100g de droga vegetal para 1L de água deionizada). A água foi levada à ebulição, resfriada a 70°C e vertida sobre o material vegetal com agitação mecânica. Após o arrefecimento da infusão até $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi realizada a filtração. Os extratos foram armazenados a -20°C

por 24h, depois a -80°C por mais 24h, e em seguida liofilizados por 14 dias (SP Scientific Advantage Plus XL-70), com condensador a -70°C e vácuo de 15 mTorr. Os extratos secos foram armazenados a -20°C.

3.1.3 *P. torta*

A infusão foi realizada exclusivamente com folhas, na proporção de 1g de material vegetal para 10mL de água destilada. A água foi aquecida até a ebulição, resfriada até 70°C e adicionada ao pó vegetal sob agitação mecânica. Ao atingir cerca de 50°C, a mistura foi filtrada. A solução extrativa foi armazenada em frascos de vidro protegidos da luz, congelada e posteriormente liofilizada (SP Scientific Advantage Plus XL-70). Os extratos secos foram mantidos a -20°C.

3.2 Isolados bacterianos

Para a avaliação da atividade antimicrobiana e sinergismo entre os extratos vegetais foram utilizadas cepas de referência e isolados clínicos multirresistentes. As cepas de referência pertencem à coleção *American Type Culture Collection* (ATCC) e incluem *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Também foram incluídos isolados clínicos multirresistentes provenientes da bacterioteca do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LABRESIS-HCPA) (Magiorakos *et al.*, 2012).

Tabela 2. Isolados clínicos multirresistentes utilizados no estudo de atividade antimicrobiana isolado e em combinação entre os extratos vegetais.

Isolados Clínicos	Resistência
<i>Enterobacter</i> spp. (92P)	Resistente ao meropenem e polimixina B
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (12P)	Resistente ao meropenem e polimixina B
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (6P)	Resistente ao meropenem e polimixina B
<i>Serratia</i> spp. (54P)	Resistente ao meropenem e polimixina B*

*Fenótipo esperado resistente

Para avaliação da atividade sinérgica entre os extratos vegetais e a polimixina B, o isolado clínico *Serratia* spp. (54P) foi excluído devido ao seu fenótipo esperado resistente à polimixina B. Optou-se por não incluir cepas de referência ATCC, pois o objetivo foi avaliar a eficácia da polimixina B frente a isolados clínicos multirresistentes. Foram escolhidos três isolados clínicos com perfis distintos de

resistência para polimixina B: isolado clínico de *K. pneumoniae* (6P) com CIM alta para polimixina B (250µg/mL), isolado de *K. pneumoniae* (12P) com CIM intermediária para polimixina B (7,9µg/mL) e isolado clínico de *Enterobacter* spp. (92P) com CIM menor para polimixina B (3,9µg/mL). A seleção visou representar diferentes níveis de sensibilidade à polimixina B, permitindo uma análise comparativa da eficácia do antimicrobiano frente a isolados com diferentes perfis fenotípicos de resistência.

3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos isolados

Antes da realização dos ensaios de sinergismo, foi conduzido um experimento preliminar com o objetivo de determinar a CIM individual dos extratos vegetais e da polimixina B frente a cada isolado bacteriano. Para isso, empregou-se o método de microdiluição em caldo, utilizando placas de 96 poços. Esse método baseia-se na realização de diluições seriadas dos compostos testados em meio Mueller-Hinton cátion ajustado (MHCA), permitindo a análise da atividade antimicrobiana em diferentes concentrações.

Inicialmente, foram adicionados 50µL de MHCA em todos os poços, exceto na linha 1. Na linha 1 foram adicionados 100µL dos extratos (10mg/mL) a serem testados ou a polimixina B (500µg/mL). Em seguida, realizou-se uma diluição seriada de 50µL do poço 1 até o poço 10, descartando-se o volume excedente do último poço, de forma a obter uma faixa de concentrações decrescentes do antimicrobiano.

O inóculo bacteriano utilizado nos ensaios foi previamente padronizado de acordo com a escala 0,5 de McFarland, o que corresponde a uma concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Essa suspensão foi então diluída na proporção de 1:100, atingindo uma concentração final de 5×10^5 UFC/mL. Posteriormente, 50µL dessa suspensão bacteriana padronizada foram adicionados aos poços das linhas 1 a 10 das colunas B a D e H a F. As colunas E e A foram utilizadas como controle de cor (sem adição de inóculo bacteriano) com a finalidade de verificar possíveis interferências dos extratos/polimixina B no resultado da leitura. A linha 11 da placa foi designada como controle positivo composta por 50µL de inóculo bacteriano e 50µL de MHCA, enquanto a linha 12 foi utilizada como controle negativo, contendo apenas 100µL de MHCA, sem adição de inóculo.

A placa foi então incubada a 35 ± 2 °C por um período de 18 ± 2 horas, para posterior análise dos resultados. Após incubação, foi adicionada nos poços uma solução de resazurina 0,1% (10µL) e aguardou-se 2 horas para que apresentasse

completa reação. A resazurina, um indicador redox, apresenta coloração azul em sua forma oxidada (inativa), mas, na presença de crescimento bacteriano, é reduzida metabolicamente a resorufina, adquirindo uma coloração rosa. Essa mudança, permite que a placa seja facilmente interpretada, sendo um marcador confiável de atividade metabólica e, conseqüentemente, de proliferação bacteriana, permitindo a interpretação dos resultados dos ensaios antimicrobianos (Vieira-da-Silva; Castanho 2023) (Figura3).

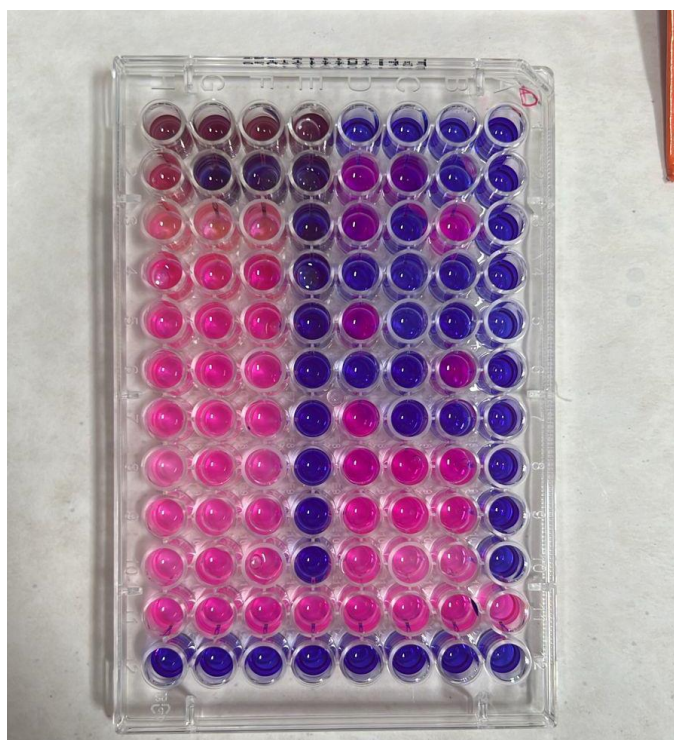


Figura 3. Placa com resazurina após 18 horas de incubação + 2 horas de reação.

Após a incubação, os resultados foram analisados e interpretados com base nos pontos de corte estabelecidos pelo BrCAST. De acordo com esses critérios, a Concentração Inibitória Mínima é definida como a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir visivelmente o crescimento bacteriano. Para a polimixina B, valores de CIM iguais ou superiores a 4µg/mL são interpretados como indicativos de resistência, enquanto valores iguais ou inferiores a 2µg/mL são considerados sensíveis (BrCAST, 2024).

3.4 Avaliação do sinergismo através do Método *Checkerboard* (tabuleiro de xadrez)

Este experimento foi conduzido com base no protocolo descrito por Bellio e colaboradores (2021). Inicialmente, foi adicionado 100µL de meio MHCA na concentração 2X (MHCA 2X) em todos os poços da placa de 96 poços. Em seguida, 100µL do composto "A", na concentração de 20mg/mL, foi adicionado aos poços da fileira A, do poço 1A ao 12A, e então submetido à diluição seriada (100µL) ao longo das fileiras A até G, mantendo-se a fileira H como controle, sem o composto "A". Posteriormente, 100µL do composto "B" (polimixina B 1mg/mL ou extrato B 20mg/mL) foi adicionado à coluna 12 (poços de 12A a 12H), seguido de diluição seriada (100µL) da coluna 12 até a coluna 2, sendo a coluna 1 mantida sem o composto "B".

Para cada combinação dos compostos "A" e "B", foram preparadas duas placas: uma placa teste, na qual foram inoculados 100µL da suspensão bacteriana padronizada, e uma placa controle, que recebeu 100µL de MHCA em todos os poços, sem adição de inóculo bacteriano. A análise da placa controle possibilitou a identificação de possíveis precipitações dos extratos, contribuindo para a correta interpretação dos resultados obtidos nas placas teste.

Para o preparo do inóculo bacteriano utilizado nas placas teste, as bactérias foram inicialmente ajustadas a uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, foi realizada uma diluição 1:100, obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL nos poços da placa (Figura 4).

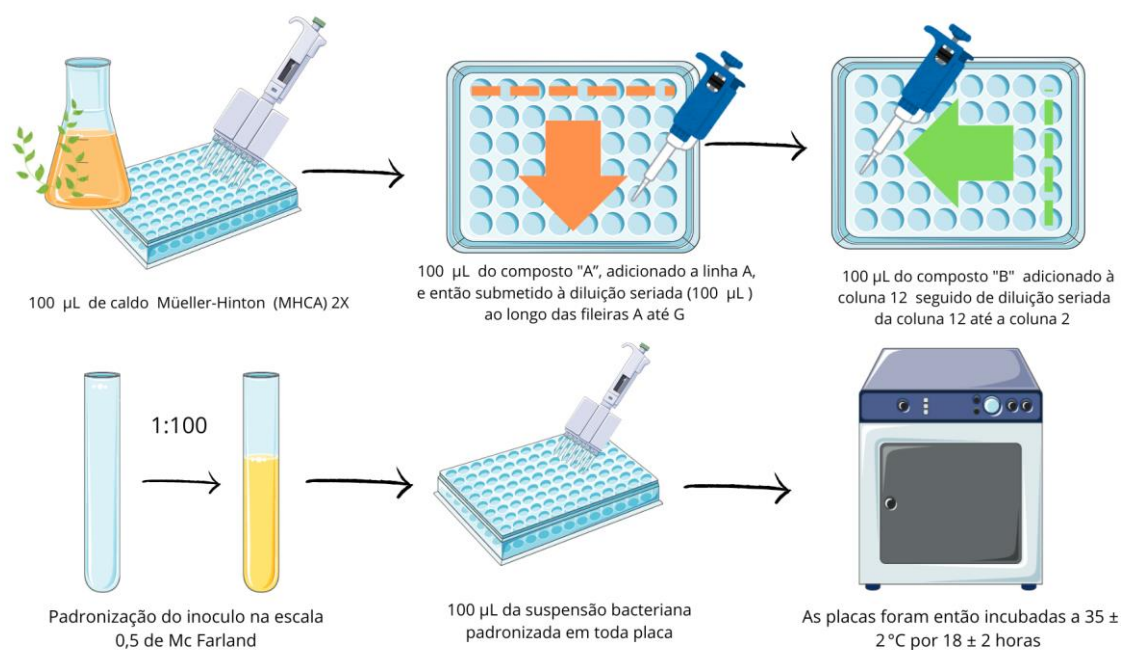


Figura 4. Modelo simplificado da metodologia *Checkerboard* (tabuleiro de xadrez).

Todas as combinações de compostos foram testadas em duplicatas técnicas, realizadas em dias distintos para garantir a reprodutibilidade dos resultados. As placas foram então incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 ± 2 horas. Após o período de incubação, a atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da leitura da densidade óptica (DO) a 600nm, utilizando leitor de microplacas (Figura 5).

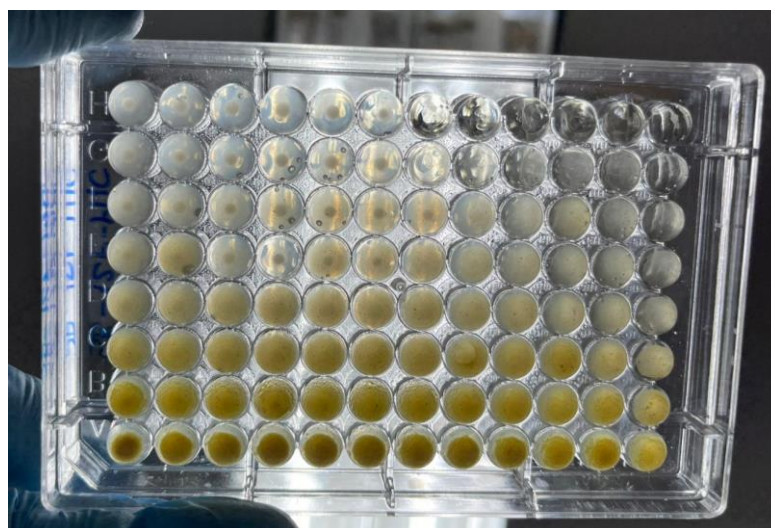


Figura 5. Placa de 96 poços após 18 horas de incubação pronta para leitura de OD.

Cada poço foi montado com a seguinte configuração e concentrações nas combinações entre extratos (Figura 6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5000A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A
		4,88B	9,76B	19,53 B	39,06 B	78,12 5B	156,2 5B	312,5 B	625B	1250B	2500B	5000B
B	2500A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A
		4,88B	9,76B	19,53 B	39,06 B	78,12 5B	156,2 5B	312,5 B	625B	1250B	2500B	5000B
C	1250A	625A	625A	625A	625A	625A	625A	625A	625A	625A	625A	625A
		4,88B	9,76B	19,53 B	39,06 B	78,12 5B	156,2 5B	312,5 B	625B	1250B	2500B	5000B
D	625A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A
		4,88B	9,76B	19,53 B	39,06 B	78,12 5B	156,2 5B	312,5 B	625B	1250B	2500B	5000B
E	312,5 A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A
		4,88B	9,76B	19,53 B	39,06 B	78,12 5B	156,2 5B	312,5 B	625B	1250B	2500B	5000B
F	156,2 5A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A
		4,88B	9,76B	19,53 B	39,06 B	78,12 5B	156,2 5B	312,5 B	625B	1250B	2500B	5000B
G	78,13 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A
		4,88B	9,76B	19,53 B	39,06 B	78,12 5B	156,2 5B	312,5 B	625B	1250B	2500B	5000B
H	CP	4,88B	9,76B	19,53 B	39,06 B	78,12 5B	156,2 5B	312,5 B	625B	1250B	2500B	5000B

Figura 6. Representação de placa de 96 poços de extratos em combinação e suas concentrações.

Quando avaliado sinergismo entre extratos e polimixina B, a placa apresentou a seguinte configuração e concentrações (Figura 7).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

A	5000A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A	2500A
		0,24B	0,49B	0,98B	1,95B	3,9B	7,8B	15,62 B	31,25 B	62,5B	125B	250B
B	2500A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A	1250A
		0,24B	0,49B	0,98B	1,95B	3,9B	7,8B	15,62 B	31,25 B	62,5B	125B	250B
C	1250A	625A	625A	625A	625A	625A	625A	625A	625A	625A	625A	625A
		0,24B	0,49B	0,98B	1,95B	3,9B	7,8B	15,62 B	31,25 B	62,5B	125B	250B
D	625A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A	312,5 A
		0,24B	0,49B	0,98B	1,95B	3,9B	7,8B	15,62 B	31,25 B	62,5B	125B	250B
E	312,5 A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A	156,2 5A
		0,24B	0,49B	0,98B	1,95B	3,9B	7,8B	15,62 B	31,25 B	62,5B	125B	250B
F	156,2 5A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A	78,13 A
		0,24B	0,49B	0,98B	1,95B	3,9B	7,8B	15,62 B	31,25 B	62,5B	125B	250B
G	78,13 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A	39,06 A
		0,24B	0,49B	0,98B	1,95B	3,9B	7,8B	15,62 B	31,25 B	62,5B	125B	250B
H	CP	0,24B	0,49B	0,98B	1,95B	3,9B	7,8B	15,62 B	31,25 B	62,5B	125B	250B

Figura 7. Representação de placa de 96 poços de extratos em combinação com a polimixina B e suas concentrações.

3.5 Análise dos resultados de leitura de OD

A análise dos resultados foi conduzida na leitura da DO, por meio da qual foi possível calcular a porcentagem de crescimento bacteriano em cada poço individualmente. Essa porcentagem foi determinada conforme a fórmula:

$$\frac{DO - DO_e}{DO \text{ poço sem extrato ou droga(1H)} - DO_e} \times 100$$

Onde, DO equivale ao poço da placa com as combinações; DOe equivale ao poço a placa controle sem a presença de bactérias

Com base nos valores de crescimento obtidos, foi possível calcular a CIM para os compostos testados isoladamente (composto “A” na coluna 1 e composto “B” na fileira H), bem como para as combinações entre eles. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato capaz de reduzir em 80% o crescimento bacteriano, ou seja, aquela que resultou em até 20% de crescimento nas placas.

A partir dos valores de CIM, calculou-se a Concentração Inibitória Fracionada (FIC), conforme as fórmulas abaixo:

$$\text{FIC do composto A} = \frac{\text{CIM do composto A em associação}}{\text{CIM do composto A isolado}}$$

$$\text{FIC do composto B} = \frac{\text{CIM do composto B em associação}}{\text{CIM do composto B isolado}}$$

A interação entre os compostos foi então determinada por meio do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI), calculado como:

$$\text{FICI} = \text{FIC A} + \text{FIC B}$$

A interpretação do resultado de FICI seguiram os critérios estabelecidos por Moon e colaboradores (2011), onde valores $\leq 0,5$ indicam efeito sinérgico; valores entre $>0,5$ e ≤ 1 efeito aditivo; entre >1 e ≤ 2 indicam efeito indiferente; e valores >2 indicam interação antagônica (Moon *et al.*, 2011).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação antimicrobiana dos extratos isolados e da polimixina B

Foram avaliadas as CIMs dos extratos frente as cepas de referência (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e isolados clínicos multirresistentes (*Enterobacter* spp. 92P, *K. pneumoniae* 12P e *Serratia* spp. 54P). Também foram avaliadas as CIMs da polimixina B para os isolados de *K. pneumoniae* 6P, *K. pneumoniae* 12P e *Enterobacter* spp. 92P (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação da CIM para os extratos sozinhos frente aos isolados bacterianos.

	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Enterobacter</i> spp. (92P)	<i>K. pneumoniae</i> (12P)	<i>Serratia</i> spp. (54P)	<i>K. pneumoniae</i> (6P)
<i>P. guajava</i>	5000µg/mL	5000µg/mL	2500µg/mL	5000µg/mL	>5000µg/mL	-
<i>P. torta</i>	>5000µg/mL	5000µg/mL	1250µg/mL	5000µg/mL	>5000µg/mL	-
<i>M. chamissois</i>	1250µg/mL	>5000µg/mL	1250µg/mL	1250µg/mL	2500µg/mL	-
Polimixina B	-	-	3,9µg/mL	7,9µg/mL	-	250 µg/mL

Os dados obtidos foram confrontados para comparação no experimento de sinergismo. Os resultados das CIMs dos extratos testados individualmente indicaram que, embora apresentem atividade antimicrobiana, as concentrações necessárias para inibição do crescimento bacteriano são elevadas. Esse fator limita seu potencial para aplicação clínica direta, devido à dificuldade de alcançar tais níveis terapêuticos de forma segura e eficaz.

4.2 Avaliação do sinergismo de combinações entre extratos vegetais e antimicrobiano

Foram avaliadas combinações binárias entre os extratos vegetais de *P. guajava* e *M. chamissois*, *P. guajava* e *P. torta*, bem como *M. chamissois* e *P. torta* (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação do sinergismo entre os extratos *M. chamissois*, *P. torta* e *P. guajava* frente a cepas referência de *E. coli* e *P. aeruginosa* e isolados clínicos

multirresistentes de *Enterobacter* spp. (92P), *Serratia* spp. (54P) e *K. pneumoniae* (12P).

Compostos e CIM isolada	Isolado bacteriano	CIM em combinação	FICI	Resultado
A: <i>P. guajava</i> 5000µg/mL B: <i>M. chamissois</i> 1250 µg/mL	<i>E. coli</i> ATCC 25922	A:2500µg/mL B: 4,88µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>P. guajava</i> 2500µg/mL B: <i>M. chamissois</i> 2500µg/mL	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	A:1250µg/mL B: 2,44µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>P. guajava</i> 5000µg/mL B: <i>M. chamissois</i> 1250µg/mL	<i>Enterobacter</i> spp. (92P)	A: 625µg/mL B: 4,88µg/mL	0,13	Sinergismo
A: <i>P. guajava</i> >5000µg/mL B: <i>M. chamissois</i> 2500µg/mL	<i>Serratia</i> spp. (54P)	A:2500µg/mL B: 4,88µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>P. guajava</i> 5000µg/mL B: <i>M. chamissois</i> 1250µg/mL	<i>K. pneumoniae</i> (12P)	A:2500µg/mL B: 4,88µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>P. guajava</i> 2500µg/mL B: <i>P. torta</i> >5000µg/mL	<i>E. coli</i> ATCC 25922	A:1250µg/mL B: 4,88µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>P. guajava</i> 5000µg/mL B: <i>P. torta</i> >5000µg/mL	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	A:2500µg/mL B: 4,88µg/mL	0,50	Sinergismo

A: <i>P. guajava</i> 2500µg/mL B: <i>P. torta</i> 1250µg/mL	<i>Enterobacter</i> spp. (92P)	A: 1250µg/mL B: 4,88µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>P. guajava</i> >5000µg/mL B: <i>P. torta</i> >5000µg/mL	<i>Serratia</i> (54P)	A: 2500µg/mL B: 4,88µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>P. guajava</i> 5000µg/mL B: <i>P. torta</i> 5000µg/mL	<i>K. pneumoniae</i> (12P)	A: 2500µg/mL B: 4,88µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>M. chamissois</i> 1250µg/mL B: <i>P. torta</i> >5000µg/mL	<i>E. coli</i> ATCC 25922	A: 625µg/mL B: 4,88µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>M. chamissois</i> 5000µg/mL B: <i>P. torta</i> >5000µg/mL	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	A: 625µg/mL B: 9,76µg/mL	0,13	Sinergismo
A: <i>M. chamissois</i> 625µg/mL B: <i>P. torta</i> 625µg/mL	<i>Enterobacter</i> spp. (92P)	A: 312,5µg/mL B: 4,88µg/mL	0,51	Adição
A: <i>M. chamissois</i> 2500µg/mL B: <i>P. torta</i> >5000µg/mL	<i>Serratia</i> spp. (54P)	A: 1250µg/mL B: 4,88µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>M. chamissois</i> 1250µg/mL B: <i>P. torta</i> 2500µg/mL	<i>K. pneumoniae</i> (12P)	A: 625µg/mL B: 4,88µg/mL	0,50	Sinergismo

As combinações entre *P. guajava* e *P. torta* revelaram sinergismo frente a todos os isolados bacterianos testados, apresentando um FICI uniforme de 0,5. A combinação *P. guajava* e *M. chamissois* também apresentou sinergismo frente a todos isolados bacterianos testados, destacando o FICI de 0,13 para o isolado clínico *Enterobacter* spp. (92P).

A combinação entre *M. chamissois* e *P. torta* também resultou em sinergismo para todos os isolados testados, com exceção do isolado clínico *Enterobacter* spp. (92P) que apresentou efeito aditivo apresentando FICI de 0,51. Vale destacar o FICI de 0,13 dessa combinação frente à *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Na etapa seguinte do estudo, foram conduzidas análises para investigar os possíveis efeitos sinérgicos resultantes da associação entre extrato vegetal e a polimixina B frente a isolados clínicos multirresistentes (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação do efeito sinérgico dos extratos *M. chamissois*, *P. torta* e *P. guajava* em combinação com polimixina B frente a isolados clínicos multirresistentes de *K. pneumoniae* (6P e 12P) e *Enterobacter* spp (92P).

Compostos e CIM isolada	Isolado bacteriano	CIM em combinação	FICI	Resultado
A: <i>P. torta</i> 5000µg/mL B: Polimixina B 250µg/mL	<i>K. pneumoniae</i> (6P)	A: 2500µg/mL B: 0,98µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>P. torta</i> 2500µg/mL B: Polimixina B 7,8µg/mL	<i>K. pneumoniae</i> (12P)	A: 2500µg/mL B: 0,24µg/mL	1,03	Indiferença
A: <i>P. torta</i> 1250µg/mL B: Polimixina B 3,9µg/mL	<i>Enterobacter</i> spp. (92P)	A: 1250µg/mL B: 0,24µg/mL	1,06	Indiferença
A: <i>M. chamissois</i> 1250µg/mL B: Polimixina B 250µg/mL	<i>K. pneumoniae</i> (6P)	A: 625µg/mL B: 0,24µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>M. chamissois</i> 625µg/mL B: Polimixina B 7,8µg/mL	<i>K. pneumoniae</i> (12P)	A: 312,5µg/mL B: 0,24µg/mL	0,53	Adição

A: <i>M. chamissois</i> 2500µg/mL B: Polimixina B 3,9µg/mL	<i>Enterobacter</i> spp. (92P)	A: 312,5µg/mL B: 0,49µg/mL	0,3	Sinergismo
A: <i>P. guajava</i> 5000µg/mL B: Polimixina B 125µg/mL	<i>K. pneumoniae</i> (6P)	A: 2500µg/mL B: 0,24µg/mL	0,50	Sinergismo
A: <i>P. guajava</i> 2500µg/mL B: Polimixina B 7,8µg/mL	<i>K. pneumoniae</i> (12P)	A: 2500µg/mL B: 0,24µg/mL	1,03	Indiferente
A: <i>P. guajava</i> 1250µg/mL B: Polimixina B 3,9µg/mL	<i>Enterobacter</i> spp. (92P)	A: 78,13µg/mL B: 0,24µg/mL	0,12	Sinergismo

Os resultados obtidos revelam um avanço significativo no enfrentamento da resistência bacteriana, particularmente no que se refere ao isolado de *K. pneumoniae* (6P). Esse isolado demonstrou sinergismo quando a polimixina B foi combinada com todos os extratos vegetais testados. A associação dos compostos resultou em uma redução expressiva na CIM da polimixina B, passando de 125–250µg/mL para 0,24–0,98µg/mL. Essa diminuição indica que o isolado, anteriormente classificado como resistente à polimixina B, tornou-se sensível quando combinado com os extratos naturais. De acordo com os critérios estabelecidos pelo Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade (BrCAST) isolados de Enterobacterales são considerados resistentes à polimixina B quando apresentam CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$, e sensíveis quando a CIM é $\leq 2\mu\text{g/mL}$. As combinações testadas resultaram em FICI $\leq 0,50$, caracterizando sinergismo entre os compostos e sugerindo que essa associação pode representar uma estratégia terapêutica promissora (BrCAST, 2024). Essa alteração nos valores de CIM possui relevância clínica considerável, tendo em vista que a polimixina B é frequentemente utilizada como antimicrobiano de última linha no tratamento de infecções causadas por patógenos multirresistentes, como *K. pneumoniae* (Paschoalette *et al.*, 2023).

A associação entre *P. torta* e polimixina B, quando testada nos isolados de *K. pneumoniae* (12P) e *Enterobacter* spp. (92P) apresentou interação indiferente, sugerindo que essa combinação não conferiu benefícios terapêuticos adicionais para esses casos específicos.

A associação entre *M. chamissois* e polimixina B apresentou sinergismo para o isolado de *Enterobacter* spp. (92P), sendo que a CIM de polimixina B diminuiu de 3,9µg/mL para 0,49µg/mL quando combinada ao extrato de planta. A mesma combinação *M. chamissois* e polimixina B apresentou efeito de adição para o isolado *K. pneumoniae* (12P), que significa que a interação entre os compostos é benéfica, mas não tão forte quanto a sinergia.

A combinação *P. guajava* e polimixina B apresentou resultado de indiferença para o isolado de *K. pneumoniae* (12P) e excelente sinergismo para *Enterobacter* spp (92P). Cabe ressaltar que apesar de algumas combinações serem classificadas como adição ou indiferença, em todos os experimentos foi observada uma considerável diminuição da CIM da polimixina B para inibição do crescimento dos microrganismos, sendo um grande achado em nosso estudo.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, o mundo enfrenta um declínio progressivo na eficácia dos antimicrobianos disponíveis para o tratamento de infecções em humanos e animais. Estamos vivendo um alerta para o início de uma era pós-antibióticos que é caracterizada pela redução gradual da atividade desses agentes frente a microrganismos que desenvolvem resistência crescente. Esse cenário representa uma ameaça significativa à saúde pública, com o risco iminente de surtos pandêmicos causados por patógenos resistentes a múltiplos fármacos (O'Neill, 2016).

Este estudo teve como objetivo identificar extratos vegetais com atividade antimicrobiana, capazes de atuar isoladamente ou em combinação com outros extratos e com a polimixina B, visando apontar potenciais candidatos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos no combate à RAM. No Brasil, a busca por recursos naturais como potenciais alternativas para tratamento de infecções se dá especialmente pela grande biodiversidade e pelo recente interesse no uso desses recursos para combate da resistência (Rocha *et al.*, 2021).

Os resultados do estudo foram promissores, uma vez que na avaliação do sinergismo entre os extratos (*M. chamissois*, *P. torta* e *P. guajava*) 14 das 15 combinações (mais de 90%) apresentaram diminuição da CIM, resultando em um efeito sinérgico. A eficácia de combinações entre extratos com atividade antimicrobiana previamente conhecida já foi demonstrada em estudos, reforçando o potencial terapêutico dessas associações para tratamento de infecções bacterianas (Sharma *et al.*, 2021).

Estudos como o de Archana e colaboradores realizado em 2022 na Índia sustentam as hipóteses deste trabalho. Para estudar o efeito antimicrobiano e sinérgico, os pesquisadores testaram a atividade antimicrobiana das combinações dos extratos das folhas de *M. zapota*, flores de *T. stans* e flores e folhas de *C. fistula* através do método de difusão em poço de ágar. O estudo avaliou os extratos frente a *S. aureus*, e como resultado as combinações de flores e folhas de *C. fistula*, bem como flores de *C. fistula* com folhas de *M. zapota* demonstraram maior atividade antibacteriana quando combinadas de forma poli herbal (três extratos em conjunto) do que quando usadas individualmente. O estudo demonstra potencial para o desenvolvimento de formulações eficazes e econômicas para tratamento de feridas (Archana *et al.*, 2022).

O achado mais relevante em nosso estudo foi a redução da CIM da polimixina B frente aos isolados bacterianos, indicando uma alternativa promissora no enfrentamento da RAM e na escassez de opções terapêuticas eficazes para o tratamento de infecções. A potencialização da ação do antimicrobiano frente ao isolado de *K. pneumoniae* (6P) quando combinada com todos os extratos vegetais testados corrobora com os resultados do estudo de Du e colaboradores (2021). Neste estudo realizado na China, os autores avaliaram o efeito sinérgico através do método *checkerboard* da floretina, um composto natural extraído de plantas, com a polimixina E contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *Salmonella* spp., *K. pneumoniae* e *A. baumannii*), sendo que algumas apresentavam resistência mediada pelo gene *mcr-1*. Como resultado o estudo obteve que a floretina potencializou a ação da polimixina E tanto em cepas com o gene *mcr-1* quanto em cepas negativas para o gene. Além disso, em camundongos infectados com *Salmonella* spp., a terapia combinada reduziu a mortalidade de 100% para 20%. A combinação de floretina (128µg/mL) com polimixina E reduziu a CIM da polimixina de 64µg/mL para ≤2µg/mL em cepas resistentes de *E. coli* e *Salmonella* spp. (Du et al., 2021), corroborando com os resultados encontrados em nosso estudo.

Em estudo recente, Mitra e colaboradores (2024), testaram o efeito sinérgico da combinação de *P. guajava* com 12 antimicrobianos (ofloxacino, levofloxacino, amoxicilina-clavulanato, cefuroxima, ceftizoxima, cefotaxima, cefalotina, trimetoprim, amicacina, tobramicina, norfloxacin e nitrofurantoína) frente a *E. coli* de amostras urinárias oriundas de pacientes internados na UTI. Neste estudo, os autores utilizaram o método de disco-difusão com os antimicrobianos e 20µL de extrato na concentração 25mg/mL. Como resultado obtiveram um aumento de até 10% na sensibilidade das amostras testadas para a combinação quando comparado com o uso dos antimicrobianos sozinhos, demonstrando que os compostos bioativos do extrato podem atuar como adjuvantes no tratamento clínico de doenças (Mitra; Hodiwala; Kar, 2024).

Outro estudo conduzido na Índia em 2020, avaliou as plantas *Callistemon lanceolatus*, *Ocimum gratissimum*, *Cymbopogon winterianus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Mentha longifolia* e *Vitex negundo* e seus óleos essenciais frente a bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *Micrococcus luteus* e *B. subtilis* e bactérias Gram-negativas *E. coli* e *K. pneumoniae*. Além de avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais sozinhos, o estudo utilizou butil-hidroxitolueno (BHT) como

antioxidante sintético, e cloranfenicol e ampicilina como antimicrobianos sintéticos para comparar o seu efeito em combinação. Os resultados revelaram interações sinérgicas significativas que podem otimizar o uso dos óleos essenciais com antimicrobianos, bem como o uso de antimicrobianos e antioxidantes (Sharma *et al.*, 2021).

Fatemi e colaboradores (2020) investigaram a atividade antibacteriana de extratos aquosos e metanólicos de duas espécies vegetais endêmicas, *Salvia chorassanica* e *Artemisia khorassanica*, contra isolados multirresistentes de *Acinetobacter*. Além disso, analisaram os efeitos sinérgicos da combinação desses extratos vegetais com antimicrobianos convencionais, amicacina e imipenem, e seu papel na inibição das bombas de efluxo. O método *checkerboard* foi utilizado para avaliar os efeitos combinados de antimicrobianos e extratos vegetais. Um ensaio de acumulação usando brometo de etídio também foi realizado para examinar os efeitos inibitórios dos extratos vegetais nas bombas de efluxo bacteriano. Como resultado o estudo concluiu que a combinação de extratos vegetais com amicacina e imipenem aumentou significativamente a sensibilidade bacteriana a esses antimicrobianos, indicando um efeito sinérgico nas combinações. Além disso, os extratos demonstraram uma capacidade de inibir as bombas de efluxo bacteriano (Fatemi *et al.*, 2021).

El-Sayed *et al.*, 2023 avaliou a atividade antibacteriana do extrato metanólico de *Ulva lactuca* sozinho e em combinação com gentamicina e cloranfenicol frente a *K. pneumoniae*. Os resultados foram promissores, e demonstraram que a combinação do extrato de *U. lactuca* com antimicrobianos promoveu efeitos sinérgicos. Esses achados evidenciam o potencial terapêutico dos extratos vegetais como estratégia complementar no enfrentamento da resistência antimicrobiana (El-Sayed; El-Sheekh; Makhlof, 2023).

Sugestão: acrescentar as limitações do trabalho aqui no final.

6 CONCLUSÃO

A crescente ineficácia dos antimicrobianos frente à emergência de cepas multirresistentes configura um dos maiores desafios contemporâneos à saúde pública global. Essa situação exige respostas inovadoras, sustentáveis e acessíveis, especialmente em países subdesenvolvidos e com alta biodiversidade como o Brasil. Nesse contexto, este estudo buscou explorar o potencial de extratos vegetais na modulação da atividade antimicrobiana, tanto de forma isolada quanto em combinação com outros extratos e com a polimixina B, visando identificar alternativas promissoras no enfrentamento da RAM. Os resultados obtidos evidenciaram um forte potencial sinérgico entre os extratos de *M. chamissois*, *P. torta* e *P. guajava*, sendo que a maioria das combinações testadas resultaram na redução da CIM, reforçando a viabilidade do uso de associações vegetais como estratégia terapêutica. Esse achado vai de encontro com a literatura nacional e internacional, que tem apontado o sinergismo entre compostos naturais como uma abordagem eficaz e de baixo custo no combate a bactérias resistentes.

Destaca-se, ainda, o achado mais importante deste trabalho sendo a capacidade de extratos em potencializar a ação da polimixina B frente a cepas bacterianas resistentes, reduzindo significativamente sua CIM. Tal efeito sinérgico reforça a hipótese de que compostos naturais podem atuar como adjuvantes terapêuticos, restaurando a eficácia de antimicrobianos já existentes.

Portanto, os resultados apresentados neste estudo não apenas demonstram o potencial terapêutico das combinações vegetais, como também contribuem para o avanço do conhecimento científico na área de produtos naturais aplicados à microbiologia. A combinação de extratos vegetais com antimicrobianos representa uma alternativa viável e economicamente acessível para mitigar a RAM, especialmente em países que, como o Brasil, detêm uma vasta diversidade de espécies com potencial farmacológico ainda pouco explorado. Estudos adicionais, incluindo a caracterização fitoquímica dos extratos, testes *in vivo* e investigações mecanísticas mais aprofundadas, são necessários para validar e assegurar a segurança no uso clínico, sendo um norte para o desenvolvimento de novos fitoterápicos ou adjuvantes antimicrobianos baseados em evidências.

REFERÊNCIAS

- ABUSHAHEEN, M. A. et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, p. 100971, 1 jun. 2020.
- ABUOUN. et al. mcr-1 and mcr-2 variant genes identified in Moraxella species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 72, n. 10, 2017.
- ALJELDAH, M. M. Antimicrobial Resistance and Its Spread Is a Global Threat. **Antibiotics**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2022.
- ALVISI, G. et al. Epidemiology and Genetic Traits of Carbapenemase-Producing Enterobacterales: A Global Threat to Human Health. **Antibiotics**, v. 14, p. 141, 2025.
- AMANPOUR, S. et al. A systematic review of medicinal plants and herbal products' effectiveness in oral health and dental cure with health promotion approach. **Journal of Education and Health Promotion**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2023.
- ARCHANA, H.; GEETHA BOSE, V. Evaluation of phytoconstituents from selected medicinal plants and its synergistic antimicrobial activity. **Chemosphere**, v. 287, p. 132276, 1 jan. 2022.
- ARMSTRONG, T.; FENN, S. J.; HARDIE, K. R. Carbapenems: a broad-spectrum antibiotic. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 12, 2021.
- ASLAM, B. et al. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 25 nov. 2021.
- AYSERT-YILDIZ, P. et al. Polymyxin B vs. colistin: the comparison of neurotoxic and nephrotoxic effects of the two polymyxins. **BMC Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, 1 dez. 2024.
- BARAN, A.; KWIATKOWSKA, A.; POTOCKI, L. Antibiotics and Bacterial Resistance-A Short Story of an Endless Arms Race. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 6, 1 mar. 2023.
- BELLIO, P. et al. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. **MethodsX**, v. 8, p. 101543, 1 jan. 2021.
- BENEDICT, R. G.; LANGLYKKE, A. Antibiotic activity of Bacillus polymyxa. **Journal of Bacteriology**, v. 52, n.1, p. 24, 1947.
- BOROWIAK, M. et al. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi B. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 72, n. 12, p. 3317–3324, 1 dez. 2017.
- BOSE, P.; RANGNEKAR, A.; DESIKAN, P. NDM-beta-lactamase-1: Where do we stand? **The Indian journal of medical research**, v. 155, n. 2, p. 243–252, 1 fev. 2022.

(BRASIL), A. N. DE V. S. Farmacopeia Brasileira 7ª edição: volume I - versão RDC nº 940/2024 - VIGENTE. 18 nov. 2024.

CARATTOLI, A. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in Salmonella and Escherichia coli, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Euro surveillance**, v. 22, n. 31, 3 ago. 2017.

CARROLL, L. M. et al. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible Salmonella enterica Serotype Typhimurium Isolate. **mBio**, v. 10, n. 3, 1 maio 2019.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. et al. Isolation of NDM-producing Providencia rettgeri in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956–2957, 1 dez. 2013.

CASTRO, M. R.; FIGUEIREDO, F. F. Saberes tradicionais, biodiversidade, práticas integrativas e complementares: o uso de plantas medicinais no SUS. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 15, n. 31, p. 56–70, 5 jul. 2019.

CHIŞ, A. A. et al. Microbial Resistance to Antibiotics and Effective Antibiotherapy. **Biomedicines**, v. 10, n. 5, 1 maio 2022.

COETZEE, J. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (MCR-1) among Escherichia coli isolated from South African patients. **South African Medical Journal**, v. 106, n. 5, p. 449–450, 1 maio 2016.

CORREIA, A. F. et al. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant Candida species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, 11 jul. 2016.

DALMOLIN, T. V. et al. Co-occurrence of mcr-1 and blaKPC-2 in a clinical isolate of Escherichia coli in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2404–2406, 1 ago. 2017.

DE ALMEIDA ALVES, T. M. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367–373, 2000.

DE SOUSA, D. P. et al. Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1144, 1 jul. 2023.

DÉCIGA-CAMPOS, M. et al. Editorial: Pharmacological interaction between drugs and medicinal plants. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 14 dez. 2022a.

DU, R. et al. Phloretin potentiates polymyxin E activity against gram-negative bacteria. **Life Sciences**, v. 287, 15 dez. 2021.

ELIAS, S. et al. Cytotoxic effect of Pouteria torta leaf extracts on human oral and breast carcinomas cell lines. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 9, n. 4, p. 601–606, 2013.

EL-SAYED, A. I. M.; EL-SHEEKH, M. M.; MAKHLOF, M. E. M. Synergistic antibacterial effects of *Ulva lactuca* methanolic extract alone and in combination with different antibiotics on multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, 1 dez. 2023.

FERNANDES, M. R. et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Euro surveillance**, v. 21, n. 17, 28 abr. 2016.

FERREIRA, J. DE F. et al. Seasonal Chemical Evaluation of *Miconia chamissois* Naudin from Brazilian Savanna. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 1120, 8 fev. 2022.

FLEMING, A. The development and use of penicillin. **The Chicago Medical School quarterly**, v. 7, n. 2, p. 20–8, mar. 1946.

FITRIANSYAH, S. N.; FIDRIANNY, I.; HARTATI, R. Pharmacological Activities and Phytochemical Compounds: Overview of *Pouteria* Genus. **Pharmacognosy Journal**, v. 13, n. 2, p. 577–584, 1 mar. 2021.

GARCÍA-BETANCUR, J. C. et al. Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 19, n. 2, p. 197–213, 1 fev. 2021.

GOMES, L. F. et al. Biological properties and phytochemical characterization from *miconia chamissois* naudin aqueous extract. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 20, n. 4, p. 427–442, 2021.

GONZALEZ-ZORN, C. S. B. Antimicrobial resistance and One Health. **Revista española de quimioterapia**, v. 35 Suppl 3, n. Suppl 3, p. 37–40, 1 out. 2022.

GRADINARU, L. M. et al. Chitosan Membranes Containing Plant Extracts: Preparation, Characterization and Antimicrobial Properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, 1 maio 2023.

HALL, A. M. et al. Investigation of the chemical composition of antibacterial *Psidium guajava* extract and partitions against foodborne pathogens. **Food Chemistry**, v. 403, p. 134400, 1 mar. 2023.

HAN, R. et al. Dissemination of Carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) Among Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated From Adult and Children Patients in China. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 314, 3 jul. 2020.

HUANG, J. et al. Chemical constituents of *Psidium guajava* leaves and their antibacterial activity. **Phytochemistry**, v. 186, p. 112746, 1 jun. 2021.

HUANG, Y. et al. Rapid detection of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China based on MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiological Methods**, v. 192, p. 106385, 1 jan. 2022.

HUSNA, A. et al. Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities. **Biomedicines**, v. 11, n. 11, 1 nov. 2023.

LAN, P. et al. A global perspective on the convergence of hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 25, p. 26–34, 1 jun. 2021.

LANCET, T. Antimicrobial resistance: time to repurpose the Global Fund. **The Lancet**, v. 399, n. 10322, p. 335, 22 jan. 2022.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical reviews in microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76–94, fev. 2014.

LANGFORD, B. J. et al. Antimicrobial resistance in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet. Microbe**, v. 4, n. 3, p. e179–e191, 1 mar. 2023.

LEE, Y. L. et al. Carbapenemase-producing Enterobacterales infections: recent advances in diagnosis and treatment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 59, n. 2, p. 106528, 1 fev. 2022.

LEPE, J. A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. **Medicina Intensiva**, v. 46, n. 7, p. 392–402, jul. 2022.

LING, Z. et al. Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 75, n. 11, p. 3087–3095, 1 nov. 2020.

LIU, Y. Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 1 fev. 2016.

LOK, B. et al. The Anticancer Potential of *Psidium guajava* (Guava) Extracts. **Life**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2023.

MALARA, F. DE A. et al. Medicinal plants from brazilian cerrado biome: Potential sources of new anti-inflammatory compounds and antitumor agents on ehrlich carcinoma. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 93, n. suppl 3, 2021.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 1 mar. 2012.

MENEZES FILHO, A. C. P.; et al. Prospecção fitoquímica, físico-química e atividades biológicas do extrato etanólico floral de *Miconia chamissois* Naudin (Melastomataceae). **Hoehnea**, v. 49, p. e502021, 30 nov. 2022.

MITRA, S.; HODIWALA, A. V. B.; KAR, H. Susceptibility and Synergistic Effects of Guava Plant Extract and Antimicrobial Drugs on *Escherichia coli*. **Cureus**, v. 16, n. 1, p. e52345, 16 jan. 2024.

MONTEIRO, J. et al. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333, jan. 2008.

MORRISON, L.; ZEMBOWER, T. R. Antimicrobial Resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 619–635, 2020.

MOUBARECK, C. A. Polymyxins and Bacterial Membranes: A Review of Antibacterial Activity and Mechanisms of Resistance. **Membranes**, v. 10, n. 8, p. 181, 2020.

MURRAY, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 12 fev. 2022.

NETO, G. G.; DE MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 561–584, 1 out. 2003.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 821–830, 1 set. 2014.

OLIVEIRA, A. C. DE et al. *Pouteria* spp. fruits: Health benefits of bioactive compounds and their potential for the food industry. **Food Research International**, v. 173, p. 113310, 1 nov. 2023.

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations**. 19 maio 2016. Acesso em: 1 jul. 2025.

PAUL, M. et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 28, p. 521–547, 2022a.

PEDROSO, R. D. S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, n. 2, p. e310218, 16 jul. 2021.

RAMATA-STUNDA, A. et al. Synergistic Effect of Polyphenol-Rich Complex of Plant and Green Propolis Extracts with Antibiotics against Respiratory Infections Causing Bacteria. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2022.

RIGATTO, M. H.; FALCI, D. R.; ZAVASCKI, A. P. Clinical Use of Polymyxin B. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1145, p. 197–218, 2019.

ROCHA, L. P. B. DA et al. Use of medicinal plants: History and relevance. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e44101018282–e44101018282, 5 ago. 2021.

RODRÍGUEZ-SANTIAGO, J. et al. Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in the Americas. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 58, n. 5, p. 106426, 1 nov. 2021.

SALES, P. M. et al. *Pouteria torta* epicarp as a useful source of α -amylase inhibitor in the control of type 2 diabetes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, n. Pt 2, p. 962–969, 1 nov. 2017.

SUN, S. et al. Identification of two KPC variants, KPC-204 and KPC-227, in ST11-K64 *Klebsiella pneumoniae* during prolonged hospitalization of a single patient. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, p. 1543470, 17 jun. 2025.

SANTOS, R. F. E. P. et al. Estudo do potencial antimicrobiano e citotóxico da espécie *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 367–373, 25 jul. 2015.

SAQUIB, S. A. et al. Synergistic antibacterial activity of herbal extracts with antibiotics on bacteria responsible for periodontitis. **Journal of infection in developing countries**, v. 15, n. 11, p. 1685–1693, 1 nov. 2021.

SHAHZAD, S.; WILLCOX, M. D. P.; RAYAMAJHEE, B. A Review of Resistance to Polymyxins and Evolving Mobile Colistin Resistance Gene (*mcr*) among Pathogens of Clinical Significance. **Antibiotics**, v. 12, n. 11, 1 nov. 2023.

SHARMA, K. et al. Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112569, 15 out. 2020.

SHEN, C. et al. Dynamics of *mcr-1* prevalence and *mcr-1*-positive *Escherichia coli* after the cessation of colistin use as a feed additive for animals in China: a prospective cross-sectional and whole genome sequencing-based molecular epidemiological study. **The Lancet Microbe**, v. 1, n. 1, p. e34–e43, 1 maio 2020.

SILVA, T.. Estudo químico e avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antidiabética de espécies de *Miconia* (Melastomataceae). 2023. 328 f. **Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2023.

SKOSANA, P. P. et al. Exploring Nanotechnology as a Strategy to Circumvent Antimicrobial Resistance in Bone and Joint Infections. **ACS Omega**, v. 8, n. 18, p. 15865–15882, 9 maio 2023.

SONG, Y. J. et al. Anti-Biofilm Activity of Grapefruit Seed Extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 1177–1183, 28 ago. 2019.

STRATHDEE, S. A. et al. Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. **Cell**, v. 186, n. 1, p. 17–31, 5 jan. 2023.

TSIOUTIS, C.; EICHEL, V. M.; MUTTERS, N. T. Transmission of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: the role of infection control. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 76, n. Suppl 1, p. I4–I11, 1 jan. 2021.

VIEIRA-DA-SILVA, B.; CASTANHO, M. A. R. B. Resazurin Reduction-Based Assays Revisited: Guidelines for Accurate Reporting of Relative Differences on Metabolic Status. **Molecules**, v. 28, n. 5, 1 mar. 2023.

WANG, C. et al. Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 508–516, 1 jan. 2020.

WANG, X. et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. **Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**, p. 72, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022**. Geneva: World Health Organization; 2022.

XAVIER, B. B. et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Euro surveillance**, v. 21, n. 27, 7 jul. 2016.

YANG, Q. et al. Agents of Last Resort: An Update on Polymyxin Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 34, n. 4, p. 723–750, 1 dez. 2020.

YANG, Y. Q. et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1791–1795, 1 jul. 2018.

YIN, W. et al. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in *Escherichia coli*. **mBio**, v. 8, n. 3, 1 maio 2017.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–5054, dez. 2009.

ZOU, D.; YU, H.; LI, F. The Difference Between Polymyxin B and Polymyxin E in Causing Skin Hyperpigmentation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 16 abr. 2021.

ANEXOS

Anexo 1 – Artigo publicado relacionado ao projeto da dissertação.



microorganisms



Review

Challenges in the Detection of Polymyxin Resistance: From Today to the Future

Rebeca Siqueira Rubens ¹, Isabel de Souza Andrade Arruda ¹, Rosane Mansan Almeida ¹, Yanna Karla de Medeiros Nóbrega ¹ , Maíara dos Santos Carneiro ² and Tanise Vendruscolo Dalmolin ^{1,*}

¹ Laboratório de Microbiologia e Imunologia Clínica (LabMIC), Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Brasília 70910-900, DF, Brazil; rebecarubens9@gmail.com (R.S.R.); isabelarruda21@gmail.com (I.d.S.A.A.); rmansan@gmail.com (R.M.A.); yannanobrega@gmail.com (Y.K.d.M.N.)

² Centro de Medicina Laboratorial, Farroupilha 95170-476, RS, Brazil; maiaacarneiro7@gmail.com

* Correspondence: tanise.dalmolin@unb.br

Abstract: Antimicrobial resistance is known to be one of the greatest global threats to human health, and is one of the main causes of death worldwide. In this scenario, polymyxins are last-resort antibiotics to treat infections caused by multidrug-resistant bacteria. Currently, the reference test to evaluate the susceptibility of isolates to polymyxins is the broth microdilution method; however, this technique has numerous complications and challenges for use in laboratory routines. Several phenotypic methods have been reported as being promising for implementation in routine diagnostics, including the BMD commercial test, rapid polymyxin NP test, polymyxin elution test, culture medium with polymyxins, and the Polymyxin Drop Test, which require materials for use in routines and must be easy to perform. Furthermore, Sensititre[®], molecular tests, MALDI-TOF MS, and Raman spectroscopy present reliable results, but the equipment is not found in most microbiology laboratories. In this context, this review discusses the main laboratory methodologies that allow the detection of resistance to polymyxins, elucidating the challenges and perspectives.

Keywords: antimicrobial susceptibility; polymyxins; Gram-negative bacteria; polymyxin resistance



Citation: Rubens, R.S.; Arruda, I.d.S.A.; Almeida, R.M.; Nóbrega, Y.K.d.M.; Carneiro, M.d.S.; Dalmolin, T.V. Challenges in the Detection of Polymyxin Resistance: From Today to the Future. *Microorganisms* **2024**, *12*, 101. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010101>

Academic Editor: Sofia Costa de Oliveira

Received: 30 October 2023

Revised: 12 December 2023

Accepted: 20 December 2023

Published: 4 January 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The antimicrobial resistance has emerged as a major threat to human health in the 21st century, and is one of the leading causes of death worldwide [1,2]. Along with the increase in antibiotic resistance, polymyxins (colistin and polymyxin B) have been reintroduced for clinical use as valuable therapeutic options, through new formulations and dosage regimens that have considerably reduced the toxicity previously attributed to this class of antimicrobials [3,4].

In recent years, new antimicrobials have been approved for clinical use against multidrug-resistant Gram-negative bacteria, but most do not have activity against all resistance mechanisms and are not available in many parts of the world. Therefore, polymyxins are considered one of the last therapeutic alternatives and are often used as first-line therapy for treating infections caused by multidrug-resistant microorganisms, particularly the Gram-negative bacilli resistant to carbapenems [5].

It was believed that the mechanisms of resistance to polymyxins were mediated by chromosomal mutations, which led to the modification of lipid A (a component of bacterial lipopolysaccharide) through cationic substitutions, to reduce the polymyxin outer membrane interaction [6]. However, in 2015, Liu and collaborators described for the first time the polymyxin resistance mediated by a gene called mobile colistin resistance (*mcr-1*) with plasmid localization. This discovery changed the scenario of polymyxin resistance, due to the possibility of horizontal transfer and the high dissemination of this gene, becoming a

According to the EUCAST, BMD should be carried out using cation-adjusted Mueller–Hinton Broth (CA-MHB) culture medium due to its precise and standardized composition, which ensures consistent results and makes it possible to compare different studies and laboratories. The presence of Ca^{2+} ions in the culture medium is crucial to facilitate the interaction between the antibiotic and the sample, maintaining the ideal concentration. In addition, pure polyester microtiter plates are used without the addition of additives, and it is preferable to use polymyxin powders with sulphated salts. Due to the positively charged chemical structure of polymyxins and their ability to adhere to polystyrene microtiter plates (they can be negatively charged on their surface), the use of glassware to neutralize the adhesion effect is recommended [13,15,16].

However, the use of BMD can bring challenges to the laboratory routine, as well as potential mistakes when performed manually, without the aid of automated systems [17]. BMD is considered a time-consuming test and requires meticulous attention, as well as materials that are difficult to find in routine microbiology laboratories [11].

To mitigate this problem, some companies have developed products designed to detect susceptibility to polymyxins in a more simplified way, without the need for complex equipment. One example of these commercial tests is Policimbac® (Probac do Brasil, São Paulo, Brazil), which uses a microtiter plate containing lyophilized polymyxin B to determine the MIC in Gram-negative strains. Policimbac® consists of a plastic panel with twelve wells, where wells 1 to 10 contain dehydrated CA-MHB with decreasing concentrations of lyophilized polymyxin B (64 to 0.125 mg/L) [18].

Policimbac® was evaluated against 110 Gram-negative isolates (87 *Enterobacterales*, 17 *Acinetobacter* spp. and 6 *Pseudomonas aeruginosa*), including isolates of animal and human origin. The results obtained were 100% Categorical Agreement (CA), which represents the same susceptibility category when comparing Policimbac® with BMD (reference test), but only 16.4% Essential Agreement (EA), which represents the agreement of the MIC (+/− 1log) between the two methods tested. When compared to the reference test, the commercial test showed higher MICs, which may have been because there was no resuspension of the lyophilized polymyxin B, causing the wells to have lower concentrations of polymyxin and consequently increasing the MIC [18].

Rocha et al. analyzed 51 isolates of *K. pneumoniae* against Policimbac® and obtained CA rates of 98.04%. However, the EA was only 31.37%, which was attributed to the fact that the strains analyzed had counts 1 to 6 logs higher than those obtained by the BMD method. This suggests that Policimbac® was not as accurate in correctly identifying these strains when compared to the reference method. Therefore, despite the high overall sensitivity, the low performance in analytical specificity may be an obstacle to the appropriate clinical use of Policimbac® in certain scenarios [19].

Other tests for assessing susceptibility to polymyxins are available on the market, such as ComASP® (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy)—formerly SensiTest™ Colistin—which is a compact plate containing colistin in seven dilutions (0.25–16 mg/L), allowing up to four samples per plate to be tested. The plate is incubated at 36 ± 2 °C and, after the incubation period (16–20 h), it is possible to observe the growth in the wells with the naked eye and to determine the MIC. UMIC® (Biocentric, Collingswood, NJ, USA), on the other hand, is based on the same principle as ComASP® and is a plate compacted with colistin at concentrations of 0.0625 to 64 mg/L. The test comes with a small box that keeps the sample in the ideal incubation atmosphere and the result can be seen with the naked eye. The results obtained by these methods achieved acceptable CA rates of 95.9% for ComASP® and 93.8% for UMIC®. However, the EA values were 81.4% for ComASP® and 78.4% for UMIC® (acceptable EA values should be greater than 90%) [20].

The MICRONAUT MIC-Strip Colistin (MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim, Germany) is a broth microdilution system used to determine the colistin MIC for *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* groups [21]. This method includes a 96-well plate composed of eight removable plastic MIC strips with 12 wells each (colistin concentration range 0.0625 to 64 mg/L). A quantity of 50 µL of bacterial suspension

is homogenized in 11.5 mL CAMHB, followed by inoculation of each well with 100 µL of this prepared suspension. After incubation for 18–22 h at 35–37 °C, MICRONAUT-MIC strip evaluation is performed visually using a mirror [22].

A comparative study of different techniques found that the MICRONAUT MIC-Strip Colistin was strongly correlated with the reference MIC, with sensitivity and specificity of 100%, with CA and EA >90%, and no Very Major Error (VME) or Major Error (ME). This demonstrates that the technique can be used for reliable detection [22].

When two commercially available BMD colistin tests were compared—ComASP® and MICRONAUT MIC-Strip Colistin—for nonfermenting rods, the tests indicate *P. aeruginosa* CA of 98.0% and *A. baumannii* CA of 85.7% [21]. MICRONAUT MIC-Strip Colistin had 98.5% sensitivity, 99.5% specificity, 1.5% VME, and 0.5% ME against *A. baumannii* and *Enterobacterales* isolates. This test is recommended as an alternative to BMD for colistin susceptibility testing [23].

VITEK 2® COMPACT (BioMérieux, St. Louis, MO, USA) and Phoenix™ M50 (Becton Dickinson Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA) are the most widely used microbial identification and drug susceptibility analysis systems in the world [24,25]. The performance of these systems was tested against polymyxins in 132 strains of *E. coli* and 83 strains of *K. pneumoniae*, including strains positive for the *mcr-1* and *mcr-8* genes. The systems exhibited excellent CAs and EAs and no false-resistant results for *E. coli* isolates. However, the systems exhibited unacceptable rates of CAs, EAs, and false-susceptible results, especially with *K. pneumoniae* isolates. Furthermore, the systems did not demonstrate good performance for detecting strains with the *mcr-8* gene [24].

Zhu et al. reported that the VITEK 2 system yielded a high VME (25.5%) in 55 *mcr-1*-positive *E. coli* isolates, while Phoenix had an excellent CA (100%) and no ME or VME. Phoenix presented satisfactory results. However, VITEK presented unacceptable errors. The automation achieved the expected results, being reliable for *K. pneumoniae*, while for *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp., and *Pseudomonas* spp. the equipment did not meet expectations, with many errors in relation to the reference technique. Despite being systems widely used in laboratory routines, they still present results that often must be verified using BMD, making the technique unreliable for testing susceptibility to polymyxins [25].

A fully automated test is Sensititre® (ThermoFisher Diagnostics, Waltham, MA, USA), which contains a plate with wells containing different concentrations of antibiotics. A specific amount of inoculum is added to each well and the plate is incubated at 34–36 °C with humidity control for 18–24 h. Research has shown that the method showed a CA of 97.8% when compared to the reference method. In addition, Sensititre® exhibited a significantly lower error rate compared to UMIC®, which showed a VME rate of 11.3%, while Sensititre® recorded only 3%, thus demonstrating greater safety in the use of this test compared to the others [26].

2.2. Rapid Polymyxin NP Test

The Rapid Polymyxin NP Test was developed by Nordmann and Poirel with the aim of obtaining faster (≤4 h) and more accurate results, making it possible to implement it in clinical laboratories, especially in low-resource settings, where the access to antibiotic powders for BMD is limited, facilitating treatment decisions and infection control. The Rapid Polymyxin NP Test is a colorimetric method based on the metabolism of carbohydrates, with a consequent formation of acids that changes the color of the pH indicator [11,27,28].

The test is considered positive, i.e., resistant to polymyxins, if there is bacterial growth in the presence of polymyxin. The test well then changes its color to yellow, indicating carbohydrate/glucose metabolism. The test is considered negative, that is, susceptible to polymyxins, if there is no bacterial growth in the presence of polymyxin. In this case, the color does not change and remains orange [11].

The Rapid Polymyxin NP Test was tested for polymyxin B and colistin, showing positive results for both, with good sensitivity (ranging from 92 to 100%) and specificity (greater than or equal to 90%). Therefore, the NP test is ideal as a screening methodology, as well as

being able to be used in countries that face endemic spread of resistance (carbapenemase producers) [11,27–33].

The Rapid Polymyxin NP Test for *Enterobacter* spp. isolates showed limitations, with sensitivity and specificity of 25 and 100%, respectively [28]. The presence of heteroresistant subpopulations may be the cause of the altered sensitivity of the test [28,31].

The verification of the Rapid Polymyxin NP Test can be optimized using Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) at a wavelength of 430 nm. The Receiver Operator Characteristic (ROC) curve, which is used to represent the relationship between sensitivity and specificity of a quantitative diagnostic test, was used to define threshold values for each species: *K. pneumoniae* demonstrated a threshold value of 1.85; for *Enterobacter* the absorption threshold was 1.82; and for *E. coli* the threshold was determined at a value of 1.77. All the samples that showed absorbance values above the threshold were considered resistant and below the susceptibility threshold. Complementing the reading of the results showed a sensitivity of 94% and specificity of 95%, which is reasonable for complementing the NP test, and increased the objectivity of the results [34].

It was also tested against *Pseudomonas* isolates, but with a change in the pH indicator to bromocresol purple, where the change in color from yellow to purple/violet indicates bacterial growth. As well as being quick to obtain isolates, the test showed 100% sensitivity and 95% specificity [35]. When isolates of *A. baumannii* were analyzed, the Rapid Polymyxin NP Test did not show good sensitivity (41.2%) and specificity (86.1%). More objective and sensitive methods, or changes to the indicator, could provide more reliable results [36]. The RapidResa Polymyxin *Acinetobacter* NP® Test (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) uses resazurin (cell viability indicator) and showed a sensitivity of 96% and specificity of 97% [33].

The Rapid Polymyxin NP Test can also be performed directly from blood cultures, showing good performance, and is easy to implement in laboratories [31,37].

2.3. Polymyxin Broth Disk Elution Test

To try to solve the problem of the assessment limits of the polymyxin susceptibility testing and to facilitate the laboratory routine with tests as accurate as BMD, but that use available materials and are easy to perform, the alternative method of Colistin Broth Disc Elution (CBDE) was proposed [38].

CBDE is based on the elution of colistin disks in glass tubes containing CA-MHB, generating final concentrations of 0 (growth control), 1, 2, and 4 mg/L [17]. Subsequently, the standardized bacterial suspension is added, and the result is interpreted according to the established breakpoints [39].

Kanzak et al. evaluated the compatibility, error rates, and its use in the laboratory routine of 89 multidrug-resistant *K. pneumoniae* strains and 5 *E. coli* strains against the CBDE method compared to the reference method. The study obtained 100% CA, demonstrating that the performance of the CBDE test is very good when compared to the reference method [40].

Another multicenter study conducted comparative tests between CBDE and BMD and found similar results for various species, with a CA of 98.6% for *Enterobacterales*, 99.3% for *P. aeruginosa*, and 93.1% for *Acinetobacter* spp. However, specifically for *Acinetobacter* spp., a VME rate of 5.6% and ME rate of 3.3% were observed. ME indicates that the bacterium resistant to the new method is susceptible to the reference method. Although this is a serious error, it may not have as immediate and severe an impact as a VME. These higher numbers of VME and ME may indicate the need to re-evaluate the use of this technique for *Acinetobacter* [39].

Simner et al. conducted a comparative study using 121 retrospective clinical isolates, 45 prospective clinical isolates, and 6 *E. coli* isolates positive for the *mcr-1* gene. The results were like those of the studies, with CA of 98% and EA of 99%. However, the study found errors in the *mcr-1* gene-producing strains where there was a variation in MIC of 2 mg/L for CBDE and 4 mg/L for BMD, changing the categorization of the isolate from susceptible to

resistant to colistin. Therefore, it is recommended that when results with an MIC of 2 mg/L are obtained for CBDE, it should be confirmed through BMD in addition to assessing the presence of the *mcr* gene in these isolates [17].

The challenge of detecting polymyxins has led to the need to modify CBDE to make it increasingly effective and useful. In view of this, a study by Dalmolin et al. reduced the volumes used by creating the Colistin Broth Microelution (1 mL) and Colistin Microelution (200 µL) methods on 68 isolates of *Enterobacterales* and 17 non-fermenting Gram-negative bacilli. The results for *Enterobacterales* were satisfactory; however, as reported by Humphries et al., for non-fermenting Gram-negatives, the results were not satisfactory, with high values for ME and VME [39,41].

A promising study conducted by Cielo et al. investigated the elution of polymyxin B, unlike most tests, which focus on the study of colistin. The analysis involved 196 *Enterobacterales*, of which 45.9% showed resistance to polymyxin B. The results were remarkable, with a CA of 99.5% compared to the reference method, and showed 0% for ME and only 1.11% for VME [42].

The detection of strains that produce the *mcr* gene is a major concern, as the broth elution technique does not provide reliable results for bacteria in this specific condition [17]. The structure of the catalytic site of the MCR-1 enzyme is composed of a zinc-dependent metalloprotein and the addition of a chelator such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) could reduce the MIC of polymyxins in strains expressing the *mcr* gene [43–45]. Thus, a study conducted by Fenwick et al. evaluated the CBDE method with the addition of 0.5 M EDTA for strains producing the *mcr* gene. The results obtained from the CBDE + EDTA method were satisfactory and showed a sensitivity of 100% and specificity of 94.3% for *Enterobacterales* and *P. aeruginosa* strains [46].

Unfortunately, both CBDE and adaptation with the addition of EDTA are not advisable for the detection of *Acinetobacter*, as mentioned in previous studies, and further studies are needed to detect polymyxin resistance in this specific species [39,41,46]. The CBDE methodology is a useful approach with promising potential to be incorporated into laboratory practice, due to its low cost and ease of obtaining materials [42]. However, it is not recommended in the case of isolates expressing the *mcr* gene, for which the EDTA-adapted technique is more suitable [45].

2.4. Medium Culture with Polymyxin

Alternative methods for detecting polymyxin resistance based on a culture medium containing polymyxins have been studied as the need for their implementation increased. The focus of many researchers today is to provide a method that can replace or even complement the diagnosis of the reference method, since it is time-consuming and requires many materials [30,47,48].

The SuperPolymyxin™ (ELITech Group, Puteaux, France) medium is based on the eosin methylene blue (EMB) culture medium, adding 3.5 mg/L of polymyxins, along with 10 mg/L of daptomycin (to prevent the growth of *Streptococcus* and *Staphylococcus*) and 5 mg/L of amphotericin B (to prevent fungal growth). The bacterial suspension is standardized to an optical density of 0.5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/mL) and plated onto the medium and then incubated at 37 °C, for approximately 24 h. The minimum detection limit for the SuperPolymyxin™ medium was 1×10^3 CFU/mL, and bacterial isolates with growth above or equal to this were resistant to polymyxins. The culture medium showed 100% sensitivity and specificity [49].

A study carried out on stool samples ($n = 1495$) to evaluate the SuperPolymyxin™ medium showed 71.1% sensitivity and 88.6% specificity. The test is suitable for detecting colistin resistance in fecal samples, but a high proportion of susceptible isolates were reported to have grown in the culture medium, requiring confirmation by another technique [48]. Other studies have shown similar results, with values of 82 to 100% for sensitivity and 85 to 97% for specificity [30,50,51].

In addition, there is a challenge in assessing the susceptibility of *Enterobacter* spp., with a reduction in sensitivity (77.3%) due to their tendency to present heterogeneous populations [52].

Colistin Agar Spot is a method that has been increasingly developed as an alternative to the reference method, like the SuperPolymyxin™ medium. The method is based on the dilution of polymyxins in Mueller–Hinton culture medium, following specific concentrations (2.0 mg/L and 3.0 mg/L) to cover the interpretative breakpoints. The bacterial suspensions are standardized at the optical density of 0.5 McFarland and then streaked on the prepared culture medium. The plates are then incubated at 35 °C for 16 to 18 h. To analyze the results, a strain is considered susceptible if no colony growth is observed and resistant if >1 colony growth is observed. Two hundred and seventy-one (271) isolates of Gram-negative bacteria were tested against the Agar Spot method and the researchers obtained a better CA (95.4%) at the colistin concentration of 3 mg/L. The method was satisfactory for *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., and *Enterobacterales* [53].

Escalante and collaborators used a modification of the Agar Spot methodology to make a phenotypic identification of the *mcr* gene with EDTA (1 mM). The study presented 96.7% sensitivity and 83.3% specificity, demonstrating the efficiency of the method in differentiating MCR-producing colistin-resistant enterobacteria from those with chromosomal resistance mechanisms [54].

CHROMagar™ COL-APSE (Chromagar, Paris, France) is another alternative culture medium that was developed to be selective in detecting colistin resistance in *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, and *Enterobacterales* strains. CHROMagar COL-APSE presented results like those of the SuperPolymyxin medium for identifying colistin-resistant microorganisms but has greater sensitivity in the detection of MCR-producing *Enterobacterales*, in addition to providing presumptive chromogenic identification [47]. A study that evaluated some culture media demonstrated that CHROMagar™ COL-APSE had a sensitivity of 82.05% and a specificity of 66.67% and is not recommended for routine use in laboratories [55].

CHROMID® Colistin R Agar (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) is also a selective chromogenic medium that was developed for the detection of colistin resistance in Gram-negative bacteria, more specifically for *Enterobacterales*. The medium presented a sensitivity of 84.9% and a specificity of 100%, in addition to being able to inhibit the growth of Gram-positive bacteria and fungi [51]. García-Fernández et al. evaluated the performance of this medium for screening colistin-resistant *Enterobacterales* from stool samples and rectal swabs, presenting 100% specificity and sensitivity of 88.1%. Therefore, the CHROMID® Colistin R Agar culture medium proves to be very sensitive and specific for the detection of colistin-resistant *Enterobacterales*, including those that carry the *mcr-1* gene [56].

Sekyere et al. recommend that the Rapid Polymyxin NP Test and/or culture media be used in under-resourced laboratories due to their lower cost as initial screening tools [57].

2.5. Polymyxin Drop Test

Initially, the Drop Test was developed to test defensins against *Brucella* isolates. To date, it has been studied and improved so that it can be used in routine laboratories to evaluate the resistance to polymyxins. The test is based on the deposition of a single drop of polymyxin solution (16 mg/L) on a Mueller–Hinton agar plate inoculated with the isolate of interest at 0.5 McFarland [53]. The polymyxin solution, which can be made by diluting the antibiotic powder or by eluting discs containing polymyxins, has a concentration of 16 mg/L, as it has been proven that the solution performs better at this quantity. The plates are left to rest for 15 min at room temperature and subsequently incubated at 35 °C for 16 h to 18 h. After the incubation period, the isolates are considered susceptible when there is the presence of an inhibition zone with well-defined edges, regardless of the diameter, and are considered resistant when there is no presence of a halo around the drop or when there is the presence of colonies in the zone of inhibition [53,58].

The Drop Test was evaluated against 190 isolates of *Enterobacterales* (*K. pneumoniae* and *E. coli*) and 119 *P. aeruginosa* and presented CA of 100%, with no ME or VME detected for *Enterobacterales*. The CA for *P. aeruginosa* strains was 99.2%, where only one VME was observed. The Drop Test is an alternative method for testing the antimicrobial susceptibility of colistin against *K. pneumoniae*, *E. coli*, and *P. aeruginosa*. However, susceptible isolates of *P. aeruginosa* are suggested to be confirmed by BMD. Furthermore, the method has the advantages of not requiring additional equipment and allowing the testing of numerous isolates in a short period of time [59].

Another study evaluated the performance of the Drop Test in detecting the resistance to polymyxin B among *Enterobacterales* and non-fermenting Gram-negative bacilli resistant to carbapenems. In the study, 715 isolates were tested against a drop of polymyxin B at concentrations of 2, 4, and 8 mg/L, with the drop with 4 mg/L being the most accurate. The result was 95.5% CA for *Enterobacterales*, more specifically for *K. pneumoniae*. Therefore, the Drop Test is an easy and quick test to issue a response to detect resistance to polymyxin, thus accelerating the process of therapeutic intervention [60].

3. Molecular Methods

The advantages of molecular tests are rapid and accurate detection of resistance mechanisms, as well as the automated analysis of many samples. Furthermore, the molecular tests can detect resistance before its actual phenotypic expression. However, molecular tests require specialized equipment and expertise, making them expensive and less accessible in laboratories with limited resources. In addition, molecular tests can have limitations to predicting clinical results, since the resistance genotype does not always correlate with phenotypic resistance [12].

The demand for different approaches capable of identifying resistance to polymyxins motivated the investigation of methodological alternatives widely used in molecular biology, such as the polymerase chain reaction (PCR) and its variations—quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and multiplex PCR [61,62]. For well-resourced laboratories, molecular biology, especially the multiplex PCR assay, can be directly used on cultures to identify colistin-resistant isolates [57].

qPCR is one of the most common techniques when it comes to quantifying nucleic acids. This technique is applicable to both surveillance cultures and biological samples, allowing the detection of genes even when there are reduced amounts of genetic material [61]. As it is a simple method, several researchers chose to use qPCR to identify the *mcr-1* gene [63,64]. Bontron et al. used qPCR with SYBR Green to detect the *mcr-1* gene in cultured bacteria, as well as in spiked human and bovine fecal samples. The *mcr-1* gene was successfully detected, showing a minimum detection limit of 10^2 CFU/mL cultured bacteria. This test stood out for its high sensitivity and specificity, for not producing false-positive results, and for demonstrating a satisfactory result [63].

Multiplex PCR represents a valuable tool for overcoming the challenge of amplifying multiple nucleic acid targets in a single reaction. In this method, pairs of primers operate under similar conditions to identify distinct individual targets. The effectiveness of this method is directly linked to the design of the primers and the selected temperature, to avoid unwanted reactivity or reduced sensitivity [62]. The application of multiplex PCR may be particularly interesting in laboratories with limited resources, where genetic analysis is necessary to obtain information about resistance mechanisms. This technique allows for an effective and cost-effective approach to understand the bacterial resistance patterns [65].

Rebello and collaborators developed a multiplex PCR with four sets of primers to amplify the *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, and *mcr-4* genes, in addition to using the primers originally designed for *mcr-5*. This approach was validated by testing 49 animal-derived *E. coli* and *Salmonella* samples. The results demonstrated complete agreement with the whole genome sequencing data and the method was able to identify the *mcr-1*, *mcr-3*, and *mcr-4* genes, both individually and in different combinations, according to their presence in the test isolates [65].

PCR, Sanger sequencing, and qRT-PCR techniques can also be used to investigate mechanisms of chromosomal resistance to polymyxins linked to mutations in the *pmrA*, *pmrB*, *pmrC*, *pmrK*, *phoP*, and *phoQ* genes [66]. To do this, PCR is used to multiply specific segments of DNA (genes of interest) with primers that bind to the sequences flanking the target gene and DNA polymerase to amplify the chosen segment. Sanger sequencing is subsequently used to interpret the results by identifying variations or mutations [67].

Zhang et al. evaluated 504 clinical isolates of carbapenem-resistant *Enterobacterales* in patients without exposure to polymyxins. A total of 19 (3.8%) isolates resistant to polymyxins were detected, and genetic analysis of *K. pneumoniae* strains revealed the presence of insertion sequence elements, a termination codon, and genetic deletion in the *mcrB* gene, as well as a missense mutation in the *pmrB* gene (T157P). Furthermore, two *E. coli* isolates contained the *mcr-1* gene, and a strain of *Enterobacter cloacae* presented mutations of one or more nitrogenous bases in *mcrB*, which is an alert to pre-existing resistance to polymyxin among isolates resistant to carbapenems [66].

Next-generation sequencing (NGS) can be a useful tool in the surveillance of antimicrobial resistance genes by monitoring their emergence and dissemination. The method can analyze a large volume of DNA in a short space of time and consists of fragmenting the target DNA into small pieces and then attaching adapters to the ends of the fragments. The NGS platform reads the nucleotide sequences of each fragment, being performed in parallel, allowing the reading of millions of fragments simultaneously and enabling identification of genetic variations, mutations, insertions, or deletions [68].

Based on the relevance of this monitoring, Li et al. conducted a comprehensive analysis of transregional and interhost dissemination using complete sequences of 455 *mcr*-bearing plasmids (pMCRs) from 44 countries, along with data regarding the host bacteria and the regions where they were isolated. Fifty-two types of Inc replicons were found, including several fusion plasmids containing two or more types of Inc replicons, which were carried by complex host bacteria. The common observation was the occurrence of antibiotic resistance genes in pMCR, with an average of 3.9 antibiotic resistance genes (ARGs) per plasmid. Based on complete plasmid sequences, epidemic events were evidenced that occurred between different countries, over several years, in different sources and hosts. This suggests the possibility of potential spread of pMCRs between humans, food, animals, and the environment [69].

Furthermore, other gene detection tests can be used as surveillance tools, such as the microarray technique, which consists of a large number of DNA probes that can be designed to specifically bind to specific resistance genes. When the sample DNA is applied to the microarray, it is possible to determine which genes are present by hybridizing the probes [70].

Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP) is a technique that amplifies DNA with high efficiency, specificity, and rapidity under isothermal conditions. This method employs a DNA polymerase and a set of four specially designed primers that recognize a total of six distinct sequences on the target DNA [71]. LAMP can be used for the detection of the *mcr-1* gene at a constant temperature of 60–67 °C, and dispenses with the need for expensive thermocyclers used in conventional PCR. Amplification products were detected by electrophoresis, colorimetric indicator, and a lateral flow biosensor. The performance of the method for stool samples surprisingly showed a detection limit 10 times higher than that of PCR, demonstrating that the technique is promising, especially for clinical and resource-poor environments. However, a possible disadvantage is that the LAMP technique may be more susceptible to inhibitors present in samples, compared to PCR, affecting the effectiveness of LAMP amplification [72].

The portable platform (Lab-on-a-Chip—LoC system) can be used with the aim of finding a quick and economical solution to detect the *mcr-9* gene, analyzing the bacteria isolated from clinical and screening samples. The results obtained were promising and the average positive detection times were 6.58 ± 0.42 min on a conventional qPCR instrument

and 6.83 ± 0.92 min on the LoC platform. This demonstrates that LAMP can become a promising starting point for the development of a near-patient screening test [73].

4. Modern Systems: MALDI-TOF MS and Raman Spectroscopy

Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) has been incorporated into the routine of clinical laboratories as it is one of the most modern and revolutionary technologies for microbiological diagnosis, since it is practical, fast, accurate, and economical for detecting microorganisms and determining antibacterial susceptibility [74–76]. MALDI-TOF MS features two platforms that are commonly used in clinical laboratories: MALDI Biotyper® (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) and Vitek MS® (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) which feature a broad library of microbial mass spectra [76,77]. However, even though it is a quick and simple method, spectrum reproducibility may eventually fail, mainly due to closely related and/or genotypically similar species [78].

Several studies have proposed methodologies using MALDI-TOF MS to determine susceptibility to antimicrobials, including polymyxin, as well as to detect resistance mechanisms [75,78,79]. Some of these methodologies that evaluated the efficiency of MALDI-TOF MS technology in detecting resistance to polymyxins are presented below.

MALDI Biotyper-antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT-ASTRA) is based on the evaluation of differences in the protein spectra of the bacteria incubated in the presence and absence of the antimicrobial. The tubes are incubated for a certain time and then protein extraction is performed. During the extraction process, an internal control (RNase B), which has a known concentration, is added to all tubes. Afterwards, the protein extracts are analyzed using a Microflex LT/SH bench-top mass spectrometer (Bruker Daltonics, Inc.) to generate protein mass spectra for each tube (MALDI Biotyper 3.1 software). Finally, the Area Under the Curve (AUC) of the spectrum of the bacteria incubated with the antimicrobial is compared with the AUC of the spectrum of the bacteria incubated without the antimicrobial, generating the index called Relative Growth (RG), which reflects the rate of bacterial growth. An RG value close to “1” indicates that the bacteria is resistant to the antimicrobial tested. On the other hand, RG close to “0” indicates susceptible to the antimicrobial [80].

Giordano et al. evaluated the detection of colistin resistance in 139 *K. pneumoniae* isolates from hospitalized patients for MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Inc.) using FlexAnalysis v3.0 software, MALDI Biotyper v3.0 software, and ClinProtTools v3.0 software. A custom database was created, and classification algorithm models were generated. The strains were correctly identified by the system, showing recognition capacity of the algorithm based on two manually selected mass peaks in 91.8% of the isolates and cross validation in 87.6%. Colistin-resistant strains were correctly classified in 91% and colistin susceptibility was identified in 73% [78].

The main methodologies capable of detecting resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS are related to modifications in lipid A, mainly by additions of cationic groups, such as 4-amino-L-arabinose (L-Ara4N) and/or PEtN, to the lipopolysaccharide of the membrane. The addition of PEtN may occur due to the expression of *mcr*-like, a gene of great epidemiological importance today [9]. In 2016, the first study was published that evaluated the main modifications in lipid A, which could be detected by visualizing specific peaks in a spectrum generated by MALDI-TOF MS performed on a 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) [81]. Dortet and collaborators developed a technique called MALDIxin, based on MALDI-TOF MS performed on a 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems), and MS data were analyzed using Data Explorer version 4.9. The purpose of MALDIxin is discriminating mechanisms of resistance to polymyxin encoded by chromosomes and plasmids, and the approach achieved rapid (15 min) and accurate detection in samples of *E. coli*, and later in *K. pneumoniae* [82,83]. The method was also tested on *P. aeruginosa* isolates using MALDI biotyper Sirius (Bruker Daltonics, Inc.) and, in this species, specifically the signal that corresponds to lipid A can be masked in

some resistant strains. Therefore, the addition of polymyxin during the sample preparation phase can improve the detection of resistant *P. aeruginosa* [84].

MALDIxin was also optimized by calculating the value called the Polymyxin Resistance Ratio (PRR), based on the acquired spectra, and using the MALDI Biotyper Sirius system (Bruker Daltonics). PRR values were calculated by summing the intensities of the lipid A peaks attributable to the addition of PETN (m/z 1919.2) and L-Ara4N (m/z 1927.2) and dividing this number by the intensity of the peak corresponding to native lipid A (m/z 1796.2). Thus, a PRR of 0 indicates susceptibility to colistin, while a positive value indicates resistance, regardless of whether it is chromosomal or plasmid [85].

Fast Lipid Analysis Technique (FLAT) extraction was tested against strains of *Enterobacter* spp. and *K. aerogenes* using the Bruker Microflex LRF MALDI-TOF MS and presented sensitivity and specificity of 100% and 53.4%, respectively. Furthermore, the method is considered to produce faster results (~1 h after the isolate shows growth in culture) [76].

Calderaro and collaborators developed a Classifying Algorithm Model (CAM) using an Autoflex Speed mass spectrometer and data were analyzed using FlexAnalysis software (version 3.1, Bruker Daltonics) and MALDI Biotyper software (version 3.1.66, Bruker Daltonics). The authors tested three different algorithms: Genetic Algorithm (GA), Supervised Neural Network (SNN), and Quick Classifier (QC). Among them, CAMs based on SNN and GA showed the best performances: Recognition Capability (RC) of 100% and Cross-Validation (CV) values of 97.62% and 100%, respectively [86].

The Direct on Target Microdroplets Growth A (DOT-MGA) methodology is based on adding a volume of CA-MHB with antimicrobial and the same volume of a bacterial suspension to a spot on a hydrophobic plate, forming a microdrop. The plate is incubated for a few hours and then the microdrop is removed from the plate using a tissue. The plate with the dried spots is inserted into the mass spectrometer and analyzed using a MALDI Biotyper system and data are analyzed by MALDI Biotyper 3.1. When the bacteria are identified (score ≥ 1.7) in the spot containing the antimicrobial, the bacteria are considered resistant. On the other hand, when identification does not occur (score < 1.7), the bacteria are considered susceptible [87].

Barth et al. proposed a modification of the DOT-MGA methodology, using the conventional steel plate of the mass spectrometer and replacing the disposable hydrophobic plate (single use), to determine the susceptibility to polymyxin B of 122 bacterial isolates cultivated in solid medium and 117 isolates obtained directly from blood cultures positive for carbapenem-resistant Gram-negative bacilli. Bacterial suspension (0.5 McFarland for *Enterobacterales* and 1.5 McFarland for non-fermenting Gram-negative bacilli) and the same volume of a polymyxin B solution were added to obtain a final concentration of 2 mg/L and then spotted onto a reusable steel Bruker MicroFlex LT mass spectrometer (Bruker Daltonics, Inc.) target plate (6 μ L). After sample treatment, the isolate was considered resistant when it was identified by the system, even in the presence of 2 mg/L of polymyxin B, and considered susceptible when there was no identification on the equipment. The adapted DOT-MGA presented 95% and 100% CA considering colonies grown on solid media and directly from positive blood culture bottles, respectively. This result was considered very satisfactory, and an excellent alternative for evaluating susceptibility to polymyxin B, while also reducing the evaluation time to just 1 day. Furthermore, the adaptation had much lower input costs than the original technique, as the conventional steel plate can be reused after washing [75].

Another study developed a new MALDI-TOF MS assay in positive ion mode, “CORE—Colistin Resistant”, that allows quantitative or qualitative discrimination between colistin-susceptible or -resistant strains of *K. pneumoniae* within 3 h using the Autof 1000 MS Mass Spectrometer (Autobio Diagnostics, Zhengzhou, China) and Autof Acquirer version 1.0.55 software and the library v2.0.61. This method may be useful for antimicrobial stewardship and for the detection and control of resistant strains in hospital settings [88].

Inamine et al. carried out an adaptation of the MBT-ASTRA technique using the Microflex LT/SH mass spectrometer (Bruker Daltonics, Inc.). They proposed a manual

analysis of the spectra, in which three peaks specific to the bacteria and three peaks referring to the internal control would be selected using other software. This adaptation does not require the use of prototype software from the company Bruker, a manufacturer of mass spectrometers, or the R software with the MALDIquant package (<https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-023-01014-1>, accessed on 30 September 2023), making the method more accessible to laboratories that have the equipment. The results of this study indicated that this technique presented excellent sensitivity for evaluating the susceptibility of *Enterobacterales* to polymyxin B [89].

Raman spectroscopy is a form of vibrational spectroscopy, which involves the measurement of scattering spectra, where each peak generated by the spectrum represents different wavelength positions and intensities. In this way, the Raman spectrum is considered capable of generating a unique fingerprint of a given sample, in addition to providing a view of biological macromolecules (lipids, proteins and nucleic acids). To make the method more versatile, isotropic labeling with deuterium (heavy water—deuterium oxide, D₂O) is added [90].

A protocol for Raman-based antimicrobial susceptibility testing was established. The minimum metabolism inactivation concentration based on the Raman spectra (R-MIC) was developed to quantify strain susceptibility including tigecycline, polymyxin B, and vancomycin, against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *Enterococcus faecium*. In the pre-incubation stage, antibiotics are added 1 or 2 h before adding deuterium and the antibiotic is subsequently incubated with deuterium for another 3 h. Resistant strains were demonstrated to absorb more D₂O, presenting a higher carbon-deuterium ratio value (a visible carbon-deuterium characteristic band appeared on the Raman spectrum—2040–2300 cm^{−1}), while susceptible strains presented a carbon-deuterium ratio value lower than the value cutoff, indicating that these strains were possibly metabolically inhibited. The method was able to examine the antimicrobial susceptibility within 5 h with 100% CA and EA. Further clinical investigations are required to validate and popularize this new method [90].

Furthermore, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is a technique that employs nanoparticles as substrates, and it is used to characterize and differentiate colistin-resistant and -susceptible *E. coli* strains based on their distinguished SERS spectral features. This study presented 100% specificity, 99.8% sensitivity, and 100% accuracy [91].

Another study developed a rapid method for the detection of colistin resistance in *E. coli*, *A. baumannii*, and *P. aeruginosa* based on five Raman spectra of each of the samples and analyzed via the hierarchical cluster analysis method to determine whether the bacteria were resistant. The sensitivity and specificity were 90.9% and 91.1%, respectively. This method can be completed in 1.5 h, suggesting its use as a screening method [92].

Lyu et al. (2023) combined SERS spectroscopy (64 SERS spectra for each strain) and a deep learning algorithm convolutional neural network. This method was demonstrated to be noninvasive, low-cost, operational, and fast-paced, and presented high specificity and sensitivity [93].

The advantages, disadvantages, and equipment needed of the main polymyxin susceptibility tests are summarized in Table 1.

Table 1. Advantages and disadvantages of main polymyxin susceptibility testing.

Method		Advantages	Disadvantages	Equipment Needed
Phenotypic Method Broth microdilution method	Conventional BMD	- Recommended by ISO and EUCAST for determining MIC of polymyxins; - Allows comparison between different studies and laboratories (highly reproducible); - Reliable and can be automated.	- Laborious; - Time-consuming and requires meticulous attention; - Requires many materials that are difficult to find in routine microbiology laboratories (antibiotic powder).	No

Table 1. Cont.

Method	Advantages	Disadvantages	Equipment Needed
Policimbac® (Probac do Brasil)	Plate containing lyophilized polymyxin B (it is not necessary to use antibiotic powder).	Higher MICs due to the lack of resuspension of lyophilized polymyxin B.	No
ComASP® (Liofilchem)	- Compact plate (it is not necessary to use antibiotic powder); - Allows testing of multiple isolates.	- Unacceptable values for Essential Agreement (EA); - Lack of resuspension of lyophilized polymyxin.	No
UMIC® (Biocentric)	- Compact plate (it is not necessary to use antibiotic powder); - Allows testing of multiple isolates; - Small box that keeps the sample in the ideal incubation atmosphere.	- Unacceptable values for Essential Agreement (EA); - Lack of resuspension of lyophilized polymyxin.	No
MICRONAUT MIC-Strip Colistin (Merlin)	- Compact plate (it is not necessary to use antibiotic powder); - Allows testing of multiple isolates.	Lack of resuspension of lyophilized polymyxin.	No
Automated systems— VITEK® COMPACT (BioMérieux) and Phoenix™ (Becton)	- Allows testing of multiple samples; - Automated; - Fast and easy.	- Unacceptable rates of CAs, EAs, and false-susceptible results; - Unreliable for polymyxin susceptibility testing; - Cost equipment.	Yes
Sensititre® (ThermoFisher Diagnostics)	- Fully automated test; - Humidity and temperature control; - High concordance with the reference method; - Exhibits significantly lower error rates compared to other tests.	Cost of reagents and equipment.	Yes
Phenotypic Method Rapid Polymyxin NP Test	- Fast (≤4 h); - Performed directly from blood cultures; - Good performance; - Easy to implement in laboratories; - Low cost.	- Limitations for <i>Enterobacter</i> spp. (heteroresistant subpopulations); <i>Acinetobacter baumannii</i> did not show good sensitivity and specificity.	No. Can be optimized using Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Phenotypic Method Polymyxin Broth Disk Elution Test	- Accurate and reliable results; - Available materials use in routine; - Easy; - Low Cost; - Good performance.	Limitation in <i>Acinetobacter</i> spp. isolates and in strains that express <i>mcr-1</i> gene (addition of EDTA may be necessary).	No.
Phenotypic Method Medium Culture with Polymyxin (SuperPolymyxin medium, Agar Spot, CHROMagar™ COL-APSE, CHROMID® Colistin R Agar)	- Can be performed from stool samples and rectal swabs; - Efficiency in differentiating MCR-producing colistin-resistant enterobacteria from those with chromosomal resistance mechanisms (Agar Spot + EDTA); - Low cost; - Easy.	- Challenge in assessing the susceptibility of <i>Enterobacter</i> spp. (heterogeneous populations); - CHROMagar™ COL-APSE presented low sensitivity and specificity.	No

Table 1. Cont.

Method	Advantages	Disadvantages	Equipment Needed
Phenotypic Method Polymyxin Drop Test	• Easy and fast; • Allows testing of multiple isolates; • Low cost; • Available materials use in routine.	• Challenge in assessing the susceptibility of <i>P. aeruginosa</i>.	No
Molecular Method (PCR, qRT-PCR, Multiplex PCR, Sanger Sequencing, Next-Generation Sequencing, Microarray)	• Reduced amounts of genetic material (detection limit of 10^2 CFU/mL); • Multiple nucleic acid targets in a single reaction (Multiplex PCR); • Identification of genetic variations, mutations, insertions, or deletions (sequencing).	• Specific optimization for different genes; • Cost of reagents and equipment; • Expertise in primer design and bioinformatic.	Yes
Molecular Method (Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA)	• High efficiency and specificity; • Fast; • Dispense the need for expensive thermocyclers used in PCR; • Detection limit 10 times higher than PCR.	• Susceptible to inhibitors present in clinical samples; • Expertise in primer design and bioinformatic.	Yes
Modern Systems (MALDI-TOF MS)	• Simple; • Fast; • Accurate and economical.	• Spectrum reproducibility may eventually fail, mainly due to closely related and/or geno-typically similar species. • Cost of equipment.	Yes
Modern Systems (Raman spectrometry)	• Low-cost; • Operational; • Fast.	• Cost of equipment; • Materials that are difficult to find in routine microbiology.	Yes

5. Conclusions

The resurgence of clinical use of polymyxins has assumed an important role as therapy for infections caused by Gram-negative bacteria that might otherwise be intractable. Given this, it is essential that polymyxins are used in an optimized way to preserve their activity for as long as possible, since antimicrobial resistance is a growing public health problem worldwide, having a significant impact on human health and the economy worldwide.

The challenges of polymyxin susceptibility testing are undeniable and numerous. The reference test has challenges and controversies. The development and improvement of standardized, fast, easy, and low-cost polymyxin susceptibility tests are extremely important for incorporation in clinical microbiology laboratories, especially where there is a shortage of materials.

Several methods to determine the susceptibility to polymyxins are reported as promising for implementation, according to the structure of each clinical laboratory.

There are two different yet supplementary perspectives for the future of polymyxin susceptibility tests: (1) the phenotypic methods, such as the Rapid Polymyxin NP Test and Drop Test, for screening and/or for laboratories with few technological resources, which require methods that can use available materials in the routine and are easy to perform and low-cost; and (2) modern systems, such MALDI-TOF, Sensititre®, and molecular tests, to confirm results and understand the polymyxin resistance, and/or for laboratories with technological resources. Despite obtaining reliable results, most routine laboratories lack the required equipment, and such tests are widely used in research. It is expected that, in

the future, laboratories will have access to these technologies via the reduction in equipment required and the input costs.

Author Contributions: Conceptualization, R.S.R., I.d.S.A.A. and T.V.D.; writing—original draft preparation, R.S.R., I.d.S.A.A., M.d.S.C. and T.V.D.; writing—review and editing, R.M.A., Y.K.d.M.N. and T.V.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The author(s) declare financial support was received for the publication of this article. This publication was supported by a grant from the University of Brasília (UnB).

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lancet, T. Antimicrobial Resistance: Time to Repurpose the Global Fund. *Lancet* **2022**, *399*, 335. [CrossRef]
2. Murray, C.J.L.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Aguilar, G.R.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655. [CrossRef]
3. Molina, J.; Cordero, E.; Pachón, J. New Information about the Polymyxin/Colistin Class of Antibiotics. *Expert Opin. Pharmacother.* **2009**, *10*, 2811–2828. [CrossRef]
4. Skov, R.L.; Monnet, D.L. Plasmid-Mediated Colistin Resistance (*mcr-1* gene): Three Months Later, the Story Unfolds. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, 30155. [CrossRef]
5. Soman, R.; Bakthavatchalam, Y.D.; Nadarajan, A.; Dwarakanathan, H.T.; Venkatasubramanian, R.; Veeraraghavan, B. Is It Time to Move Away from Polymyxins?: Evidence and Alternatives. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2021**, *40*, 461–475. [CrossRef]
6. Ye, H.; Li, Y.; Li, Z.; Gao, R.; Zhang, H.; Wen, R.; Gao, G.E.; Hu, Q.; Feng, Y. Diversified *mcr-1*-Harboring Plasmid Reservoirs Confer Resistance to Colistin in Human Gut Microbiota. *mBio* **2016**, *7*, e00177-16. [CrossRef]
7. Mmatli, M.; Mbelle, N.M.; Osei Sekyere, J. Global Epidemiology, Genetic Environment, Risk Factors and Therapeutic Prospects of *mcr* Genes: A Current and Emerging Update. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 1210. [CrossRef]
8. Baron, S.; Hadjadj, L.; Rolain, J.-M.; Olaitan, A.O. Molecular Mechanisms of Polymyxin Resistance: Knowns and Unknowns. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2016**, *48*, 583–591. [CrossRef]
9. Liu, Y.-Y.; Wang, Y.; Walsh, T.R.; Yi, L.-X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, C.; Dong, B.; Huang, X.; et al. Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism MCR-1 in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 161–168. [CrossRef]
10. Neumann, B.; Rackwitz, W.; Hunfeld, K.-P.; Fuchs, S.; Werner, G.; Pfeifer, Y. Genome Sequences of Two Clinical *Escherichia coli* Isolates Harboring the Novel Colistin-Resistance Gene Variants *mcr-1.26* and *mcr-1.27*. *Gut Pathog.* **2020**, *12*, 40. [CrossRef] [PubMed]
11. Nordmann, P.; Jayol, A.; Poiriel, L. Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1038–1043. [CrossRef] [PubMed]
12. Ezadi, F.; Ardebili, A.; Mimejad, R. Antimicrobial Susceptibility Testing for Polymyxins: Challenges, Issues, and Recommendations. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e01390-18. [CrossRef] [PubMed]
13. Poiriel, L.; Jayol, A.; Nordmann, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 557–596. [CrossRef] [PubMed]
14. ISO 20776-1; Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2019.
15. Singhal, L.; Sharma, M.; Verma, S.; Kaur, R.; Britto, X.B.; Kumar, S.M.; Ray, P.; Gautam, V. Comparative Evaluation of Broth Microdilution with Polystyrene and Glass-Coated Plates, Agar Dilution, E-Test, Vitek, and Disk Diffusion for Susceptibility Testing of Colistin and Polymyxin B on Carbapenem-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microb. Drug Resist.* **2018**, *24*, 1082–1088. [CrossRef]
16. EUCAST. EUCAST: Reading Guide for Broth Microdilution. Version 4.0. January 2022. Available online: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2022_manuals/Reading_guide_BMD_v_4.0_2022.pdf (accessed on 21 September 2023).
17. Simmer, P.J.; Bergman, Y.; Trejo, M.; Roberts, A.A.; Marayan, R.; Tekle, T.; Campeau, S.; Kazmi, A.Q.; Bell, D.T.; Lewis, S.; et al. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test to Determine Colistin in Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *57*, e01163-18. [CrossRef]
18. Dalmolin, T.V.; Carneiro, S.; Peres, L.; Zempulski, C.; Wink, P.L.; Lima-Morales, D.; Luís, A. Barth Evaluation of the Susceptibility Test of Polymyxin B Using the Commercial Test Policimbac®. *Braz. J. Microbiol.* **2020**, *51*, 1135–1137. [CrossRef]
19. Rocha, N.C.; Lopes, J.B.; Russi, K.L.; Palmeiro, J.K.; Girardello, R. Low Performance of Policimbac® Broth Microdilution in Determining Polymyxin B MIC for *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2023**, *13*, 1139784. [CrossRef]

20. Jeannot, K.; Gaillot, S.; Triponney, P.; Portets, S.; Pourchet, V.; Fournier, D.; Potron, A. Performance of the Disc Diffusion Method, MTS Gradient Tests and Two Commercially Available Microdilution Tests for the Determination of Cefiderocol Susceptibility in *Acinetobacter* spp. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1971. [CrossRef]
21. Depka, D.; Mikucka, A.; Bogiel, T.; Gospodarek-Komkowska, E. Comparison of the Recommended Colistin Susceptibility Testing Methods with Colistin Gradient Strips and Semi-Automated Method for Antimicrobial-Resistant Non-Fermenting Rods. *J. Microbiol. Methods* **2020**, *172*, 105905. [CrossRef]
22. Földes, A.; Székely, E.; Voidăzan, S.T.; Dobreanu, M. Comparison of Six Phenotypic Assays with Reference Methods for Assessing Colistin Resistance in Clinical Isolates of Carbapenemase-Producing *Enterobacterales*: Challenges and Opportunities. *Antibiotics* **2022**, *11*, 377. [CrossRef]
23. Kon, H.; Dalak, B.; Schwartz, D.; Carmeli, Y.; Lellouche, J. Evaluation of the MICRONAUT MIC-Strip Colistin Assay for Colistin Susceptibility Testing of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Enterobacterales*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2021**, *100*, 115391. [CrossRef] [PubMed]
24. Zhang, Q.; Yan, W.; Zhu, Y.; Jing, N.; Wang, S.; Yuan, Y.; Ma, B.; Xu, J.; Chu, Y.; Zhang, J.; et al. Evaluation of Commercial Products for Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for *mcr*-Positive and Negative *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *Infect. Drug Resist.* **2023**, *16*, 1171–1181. [CrossRef] [PubMed]
25. Zhu, Y.; Jia, P.; Zhou, M.; Zhang, J.; Zhang, G.; Kang, W.; Duan, S.; Wang, T.; Xu, Y.; Yang, Q. Evaluation of the Clinical Systems for Polymyxin Susceptibility Testing of Clinical Gram-Negative Bacteria in China. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 610604. [CrossRef] [PubMed]
26. Jayol, A.; Nordmann, P.; André, C.; Poirel, L.; Dubois, V. Evaluation of Three Broth Microdilution Systems to Determine Colistin Susceptibility of Gram-Negative Bacilli. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1272–1278. [CrossRef] [PubMed]
27. Mitton, B.; Kingsburgh, C.; Kock, M.M.; Mbelle, N.M.; Strydom, K. Evaluation of an In-House Colistin NP Test for Use in Resource-Limited Settings. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e00501-19. [CrossRef] [PubMed]
28. Simar, S.; Sibley, D.; Ashcraft, D.; Pankey, G. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP Test for Polymyxin B Resistance Detection Using *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 3016–3020. [CrossRef]
29. Jayol, A.; Kieffer, N.; Poirel, L.; Guérin, F.; Güneser, D.; Cattoir, V.; Nordmann, P. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP Test and Its Industrial Version for the Detection of Polymyxin-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *92*, 90–94. [CrossRef]
30. Conceição-Neto, O.; da Costa, B.; Pontes, L.; Santos, I.; Silveira, M.; Cordeiro-Moura, J.; Pereira, N.; Tavares-Teixeira, C.; Picão, R.; Rocha-De-Souza, C.; et al. Difficulty in Detecting Low Levels of Polymyxin Resistance in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates: Evaluation of Rapid Polymyxin NP Test, Colispot Test and SuperPolymyxin Medium. *New Microbes New Infect.* **2020**, *36*, 100722. [CrossRef]
31. Collar, G.d.S.; Raro, O.H.; da Silva, R.M.; Vezzano, P.; Mott, M.P.; da Cunha, G.R.; Riche, C.V.; Dias, C.; Caierão, J. Polymyxin NP Tests (from Colonies and Directly from Blood Cultures): Accurate and Rapid Methodologies to Detect Polymyxin B Susceptibility among *Enterobacterales*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2021**, *99*, 115264. [CrossRef]
32. Dalmolin, T.V.; Dias, G.Á.; de Castro, L.P.; Ávila, H.; Magagnin, C.M.; Zavascki, A.P.; de Lima-Morales, D.; Barth, A.L. Detection of *Enterobacterales* Resistant to Polymyxins Using Rapid Polymyxins NP Test. *Braz. J. Microbiol.* **2019**, *50*, 425–428. [CrossRef]
33. Bouvier, M.; Sadek, M.; Pomponio, S.; D’Emidio, F.; Poirel, L.; Nordmann, P. RapidResa Polymyxin *Acinetobacter* NP[®] Test for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics* **2021**, *10*, 558. [CrossRef] [PubMed]
34. Belda-Orlowski, A.; Pfennigwerth, N.; Gatermann, S.G.; Korte-Berwanger, M. Evaluation and Readout Optimization of the Rapid Polymyxin NP Test for the Detection of Colistin-Resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Med. Microbiol.* **2019**, *68*, 1189–1193. [CrossRef] [PubMed]
35. Sadek, M.; Tinguely, C.; Poirel, L.; Nordmann, P. Rapid Polymyxin/*Pseudomonas* NP Test for Rapid Detection of Polymyxin Susceptibility/Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *39*, 1657–1662. [CrossRef] [PubMed]
36. Kon, H.; Abramov, S.; Amar Ben Dalak, M.; Elmaliach, N.; Schwartz, D.; Carmeli, Y.; Lellouche, J. Performance of Rapid PolymyxinTM NP and Rapid PolymyxinTM *Acinetobacter* for the Detection of Polymyxin Resistance in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Enterobacterales*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 1484–1490. [CrossRef] [PubMed]
37. Malli, E.; Papagiannitsis, C.C.; Xitsas, S.; Tsilipounidaki, K.; Petinaki, E. Implementation of the Rapid PolymyxinTM NP Test Directly to Positive Blood Cultures Bottles. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *95*, 114889. [CrossRef]
38. CLSI M100Ed33E; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Berwyn, PA, USA, 2023. Available online: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/> (accessed on 21 September 2023).
39. Humphries, R.M.; Green, D.A.; Schuetz, A.N.; Bergman, Y.; Lewis, S.; Yee, R.; Stump, S.; Lopez, M.; Macesic, N.; Uhlemann, A.-C.; et al. Multicenter Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: A Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e01269-19. [CrossRef] [PubMed]
40. Kansak, N.; Arici, N.; Uzunoner, Y.; Adaleti, R.; Aksaray, S.; Gonullu, N. Evaluation of Broth Disk Elution Method to Determine Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Strains. *Clin. Lab.* **2023**, *69*, 391–395. [CrossRef]
41. Dalmolin, T.V.; Mazzetti, A.; Ávila, H.; Kranich, J.; Carneiro, G.I.B.; Arend, L.N.V.S.; Becker, G.N.; Ferreira, K.O.; de Lima-Morales, D.; Barth, A.L.; et al. Elution Methods to Evaluate Colistin Susceptibility of Gram-Negative Rods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *96*, 114910. [CrossRef]

42. Cielo, N.C.; Belmonte, T.; Raro, O.H.F.; da Silva, R.M.C.; Wink, P.L.; Barth, A.L.; da Cunha, G.R.; Mott, M.P.; Riche, C.V.W.; Dias, C.; et al. Polymyxin B Broth Disk Elution: A Feasible and Accurate Methodology to Determine Polymyxin B Susceptibility in *Enterobacteriales*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *98*, 115099. [\[CrossRef\]](#)
43. Hinchliffe, P.; Yang, Q.E.; Portal, E.; Young, T.; Li, H.; Tooke, C.L.; Carvalho, M.J.; Paterson, N.G.; Brem, J.; Niumsup, P.R.; et al. Insights into the Mechanistic Basis of Plasmid-Mediated Colistin Resistance from Crystal Structures of the Catalytic Domain of MCR-1. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 39392. [\[CrossRef\]](#)
44. Bell, D.T.; Bergman, Y.; Kazmi, A.Q.; Lewis, S.; Tamma, P.D.; Simner, P.J. A Novel Phenotypic Method to Screen for Plasmid-Mediated Colistin Resistance among *Enterobacteriales*. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e00040-19. [\[CrossRef\]](#)
45. Esposito, F.; Fernandes, M.R.; Lopes, R.; Muñoz, M.E.; Sabino, C.P.; Paulo, M.; Cristina; Cayó, R.; Martins, S.; Moreno, A.M.; et al. Detection of Colistin-Resistant *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* by Use of Assays Based on Inhibition by EDTA and Zeta Potential. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 3454–3465. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Fenwick, A.J.; Bergman, Y.; Lewis, S.; Yee, R.; Uhlemann, A.-C.; Cole, N.; Kohner, P.; Ordak, C.; Green, D.A.; Schuetz, A.N.; et al. Evaluation of the NG-Test MCR-1 Lateral Flow Assay and EDTA-Colistin Broth Disk Elution Methods to Detect Plasmid-Mediated Colistin Resistance among Gram-Negative Bacterial Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e01823-19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Momin, M.H.F.A.; Bean, D.C.; Hendriksen, R.S.; Haenni, M.; Phee, L.M.; Wareham, D.W. CHROMagar COL-APSE: A Selective Bacterial Culture Medium for the Isolation and Differentiation of Colistin-Resistant Gram-Negative Pathogens. *J. Med. Microbiol.* **2017**, *66*, 1554–1561. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Przybysz, S.M.; Correa-Martinez, C.; Köck, R.; Becker, K.; Schaumburg, F. SuperPolymyxinTM Medium for the Screening of Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria in Stool Samples. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2809. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Nordmann, P.; Jayol, A.; Poirel, L. A Universal Culture Medium for Screening Polymyxin-Resistant Gram-Negative Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 1395–1399. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Jayol, A.; Poirel, L.; André, C.; Dubois, V.; Nordmann, P. Detection of Colistin-Resistant Gram-Negative Rods by Using the SuperPolymyxin Medium. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *92*, 95–101. [\[CrossRef\]](#)
51. Girlich, D.; Naas, T.; Dortet, L. Comparison of the Superpolymyxin and ChromID Colistin R Screening Media for the Detection of Colistin-Resistant *Enterobacteriaceae* from Spiked Rectal Swabs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e01618-18. [\[CrossRef\]](#)
52. Germ, J.; Seme, K.; Cerar Kišek, T.; Teržan, T.; Mueller Premru, M.; Križan Hergouth, V.; Švent Kučina, N.; Pirš, M. Evaluation of a Novel Epidemiological Screening Approach for Detection of Colistin Resistant Human *Enterobacteriaceae* Isolates Using a Selective SuperPolymyxin Medium. *J. Microbiol. Methods* **2019**, *160*, 117–123. [\[CrossRef\]](#)
53. Pasteran, F.; Danze, D.; Menocal, A.; Cabrera, C.; Castillo, I.; Alborno, E.; Lucero, C.; Rapoport, M.; Ceriana, P.; Corso, A. Simple Phenotypic Tests to Improve Accuracy in Screening Chromosomal and Plasmid-Mediated Colistin Resistance in Gram-Negative Bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *59*, e01701-20. [\[CrossRef\]](#)
54. Escalante, E.G.; Yauri Condor, K.; Di Conza, J.A.; Gutkind, G.O. Phenotypic Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e01555-19. [\[CrossRef\]](#)
55. Sekyere, J.O.; Sephofane, A.K.; Mbelle, N.M. Comparative Evaluation of CHROMagar COL-APSE, MicroScan Walkaway, ComASP Colistin, and Colistin MAC Test in Detecting Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6221. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. García-Fernández, S.; García-Castillo, M.; Ruiz-Garbajosa, P.; Morosini, M.-I.; Bala, Y.; Zambardi, G.; Cantón, R. Performance of CHROMID[®] Colistin R Agar, a New Chromogenic Medium for Screening of Colistin-Resistant *Enterobacteriales*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *93*, 1–4. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Sekyere, J.O. *mcr* Colistin Resistance Gene: A Systematic Review of Current Diagnostics and Detection Methods. *MicrobiologyOpen* **2018**, *8*, e00682. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Shinohara, D.R.; de Carvalho, N.M.M.; de Mattos, M.d.S.F.; Fedrigo, N.H.; Mitsugui, C.S.; Carrara-Marroni, F.E.; Nishiyama, S.A.B.; Tognim, M.C.B. Evaluation of Phenotypic Methods for Detection of Polymyxin B-Resistant Bacteria. *J. Microbiol. Methods* **2022**, *199*, 106531. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Llorente, L.; Acero, L.A.; Javier, F.; Floren, L. Evaluating the Drop Test Method in Measuring Colistin Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **2022**, *71*, 001628. [\[CrossRef\]](#)
60. Perez, L.R.R.; Carniel, E.; Narvaez, G.A.; Dias, C.G. Evaluation of a Polymyxin Drop Test for Polymyxin Resistance Detection among Non-Fermentative Gram-Negative Rods and *Enterobacteriales* Resistant to Carbapenems. *APMIS* **2020**, *129*, 138–142. [\[CrossRef\]](#)
61. Taylor, S.C.; Nadeau, K.; Abbasi, M.; Lachance, C.; Nguyen, M.; Fenrich, J. The Ultimate QPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends Biotechnol.* **2019**, *37*, 761–774. [\[CrossRef\]](#)
62. Faggioli, F.; Luigi, M. Multiplex RT-PCR. In *Methods in Molecular Biology*; Rao, A.L.N., Lavagi-Craddock, I., Vidalakis, G., Eds.; Humana: New York, NY, USA, 2021; Volume 2316, pp. 163–179. [\[CrossRef\]](#)
63. Bontron, S.; Poirel, L.; Nordmann, P. Real-Time PCR for Detection of Plasmid-Mediated Polymyxin Resistance (*mcr-1*) from Cultured Bacteria and Stools. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 2318–2320. [\[CrossRef\]](#)
64. Chabou, S.; Leangapichart, T.; Okdah, L.; Le Page, S.; Hadjadj, L.; Rolain, J.-M. Real-Time Quantitative PCR Assay with Taqman[®] Probe for Rapid Detection of *mcr-1* Plasmid-Mediated Colistin Resistance. *New Microbes New Infect.* **2016**, *13*, 71–74. [\[CrossRef\]](#)

65. Rebelo, A.R.; Bortolaia, V.; Kjeldgaard, J.S.; Pedersen, S.K.; Leekitcharoenphon, P.; Hansen, I.M.; Guerra, B.; Malorny, B.; Borowiak, M.; Hammerl, J.A.; et al. Multiplex PCR for Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for Surveillance Purposes. *Eurosurveillance* **2018**, *23*, 17–00672. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Zhang, X.; Qu, F.; Jia, W.; Huang, B.; Shan, B.; Yu, H.; Tang, Y.; Chen, L.; Du, H. Polymyxin Resistance in Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates from Patients without Polymyxin Exposure: A Multicentre Study in China. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2021**, *57*, 106262. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Crossley, B.M.; Bai, J.; Glaser, A.; Maes, R.; Porter, E.; Killian, M.L.; Clement, T.; Toohey-Kurth, K. Guidelines for Sanger Sequencing and Molecular Assay Monitoring. *J. Veter. Diagn. Investig.* **2020**, *32*, 767–775. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Sisti, S.; Diotti, R.A.; Caputo, V.; Libera, M.; Ferrarese, R.; Carletti, S.; Rizzi, P.; Cirillo, D.M.; Lorenzin, G.; Clementi, M.; et al. Identification of a Novel Mutation Involved in Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* through Next-Generation Sequencing (NGS) Based Approaches. *New Microbiol.* **2022**, *45*, 199–209. [\[PubMed\]](#)
69. Li, Z.; Li, Z.; Peng, Y.; Lu, X.; Kan, B. Trans-Regional and Cross-Host Spread of *mcr*-Carrying Plasmids Revealed by Complete Plasmid Sequences—44 Countries, 1998–2020. *China CDC Wkly.* **2022**, *4*, 242–248. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Carvajal-Lopez, P.; Von Borstel, F.D.; Torres, A.; Rustici, G.; Gutierrez, J.; Romero-Vivas, E. Microarray-Based Quality Assessment as a Supporting Criterion for de Novo Transcriptome Assembly Selection. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* **2020**, *17*, 198–206. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Notomi, T.; Okayama, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e63. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Gong, L.; Tang, F.; Liu, E.; Liu, X.; Xu, H.; Wang, Y.; Song, Y.; Liang, J. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Combined with a Nanoparticle-Based Lateral Flow Biosensor for Rapid Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-1*. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0249582. [\[CrossRef\]](#)
73. Rodriguez-Manzano, J.; Moser, N.; Malpartida-Cardenas, K.; Moniri, A.; Fišarová, L.; Pennisi, I.; Boonyasiri, A.; Jauneikaite, E.; Abdolrasouli, A.; Otter, J.A.; et al. Rapid Detection of Mobilized Colistin Resistance Using a Nucleic Acid Based Lab-On-a-Chip Diagnostic System. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 8448. [\[CrossRef\]](#)
74. Croxatto, A.; Prod'homme, G.; Greub, G. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 380–407. [\[CrossRef\]](#)
75. Barth, P.O.; Volpato, F.C.Z.; Moreira, N.K.; Wink, P.L.; de Souza, A.C.; Barth, A.L. Evaluation of a Rapid Susceptibility Test of Polymyxin B by MALDI-TOF. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1075650. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Smith, R.D.; McElheny, C.L.; Izac, J.R.; Gardner, F.M.; Chandler, C.E.; Goodlett, D.R.; Doi, Y.; Johnson, J.K.; Ernst, R.K. A Novel Lipid-Based MALDI-TOF Assay for the Rapid Detection of Colistin-Resistant *Enterobacter* Species. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e01445-21. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Solntceva, V.; Kostrzewa, M.; Larrouy-Maumus, G. Detection of Species-Specific Lipids by Routine MALDI TOF Mass Spectrometry to Unlock the Challenges of Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2021**, *10*, 621452. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Giordano, C.; Barnini, S. Rapid Detection of Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Using MALDI-TOF MS Peak-Based Assay. *J. Microbiol. Methods* **2018**, *155*, 27–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. Barth, P.O.; Roesch, E.W.; Lutz, L.; de Souza, A.C.; Goldani, L.Z.; Pereira, D.C. Rapid Bacterial Identification by MALDI-TOF MS Directly from Blood Cultures and Rapid Susceptibility Testing: A Simple Approach to Reduce the Turnaround Time of Blood Cultures. *Braz. J. Infect. Dis.* **2023**, *27*, 102721. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
80. Lange, C.; Schubert, S.; Jung, J.; Kostrzewa, M.; Sparbier, K. Quantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Resistance Detection. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 4155–4162. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Larrouy-Maumus, G.; Clements, A.; Filloux, A.; McCarthy, R.R.; Mostowy, S. Direct Detection of Lipid a on Intact Gram-Negative Bacteria by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J. Microbiol. Methods* **2016**, *120*, 68–71. [\[CrossRef\]](#)
82. Dortet, L.; Bonnin, R.A.; Pennisi, I.; Gauthier, L.; Jousset, A.B.; Dabos, L.; Furniss, R.C.D.; Mavridou, D.A.I.; Bogaerts, P.; Glupczynski, Y.; et al. Rapid Detection and Discrimination of Chromosome- and *mcr*-Plasmid-Mediated Resistance to Polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: The MALDIxin Test. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 3359–3367. [\[CrossRef\]](#)
83. Dortet, L.; Broda, A.; Bernabeu, S.; Glupczynski, Y.; Bogaerts, P.; Bonnin, R.A.; Filloux, A.; Larrouy-Maumus, G. Optimization of the MALDIxin Test for the Rapid Identification of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Using MALDI-TOF MS. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *75*, 110–116. [\[CrossRef\]](#)
84. Jeannot, K.; Hagart, K.; Dortet, L.; Kostrzewa, M.; Filloux, A.; Plesiat, P.; Larrouy-Maumus, G. Detection of Colistin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Using the MALDIxin Test on the Routine MALDI Biotyper Sirius Mass Spectrometer. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 725383. [\[CrossRef\]](#)
85. Furniss, R.C.D.; Dortet, L.; Bolland, W.; Drews, O.; Sparbier, K.; Bonnin, R.A.; Filloux, A.; Kostrzewa, M.; Mavridou, D.A.I.; Larrouy-Maumus, G. Detection of Colistin Resistance in *Escherichia coli* by Use of the MALDI Biotyper Sirius Mass Spectrometry System. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e01427-19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Calderaro, A.; Buttrini, M.; Farina, B.; Montecchini, S.; Martinelli, M.; Crocamo, F.; Arcangeletti, M.C.; Chezzi, C.; De Conto, F. Rapid Identification of *Escherichia coli* Colistin-Resistant Strains by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Microorganisms* **2021**, *9*, 2210. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

87. Idelevich, E.A.; Sparbier, K.; Kostrzewa, M.; Becker, K. Rapid Detection of Antibiotic Resistance by MALDI-TOF Mass Spectrometry Using a Novel Direct-On-Target Microdroplet Growth Assay. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 738–743. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Foglietta, G.; De Carolis, E.; Mattana, G.; Onori, M.; Agosta, M.; Niccolai, C.; Di Pilato, V.; Rossolini, G.M.; Sanguinetti, M.; Perno, C.F.; et al. "CORE" a New Assay for Rapid Identification of *Klebsiella pneumoniae* Colistin RESistant Strains by MALDI-TOF MS in Positive-Ion Mode. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1045289. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Inamine, É.; Carneiro, S.; Wilhelm, C.M.; Barth, A.L. Evaluation of an Adapted Method of Relative Growth to Determine the Susceptibility of *Enterobacterales* to Polymyxin B by MALDI-TOF MS. *Braz. J. Microbiol.* **2023**, *54*, 1841–1846. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
90. Xiao, Z.; Qu, L.; Chen, H.; Liu, W.; Zhan, Y.; Ling, J.M.; Shen, H.; Yang, L.; Chen, D. Raman-Based Antimicrobial Susceptibility Testing on Antibiotics of Last Resort. *Infect. Drug Resist.* **2023**, *16*, 5485–5500. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
91. Mushtaq, A.; Nawaz, H.; Majeed, M.I.; Rashid, N.; Tahir, M.; Nawaz, M.; Shahzad, K.; Dastgir, G.; Zaki, R.; Haq, A.; et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Monitoring Colistin-Resistant and Susceptible *E. coli* Strains. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2022**, *278*, 121315. [\[CrossRef\]](#)
92. Lin, Z.; Zhao, X.; Huang, J.; Liu, W.; Zheng, Y.; Yang, X.; Zhang, Y.; Chapelle, M.L.; Fu, W. Rapid Screening of Colistin-Resistant *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* by the Use of Raman Spectroscopy and Hierarchical Cluster Analysis. *Analyst* **2019**, *144*, 2803–2810. [\[CrossRef\]](#)
93. Lyu, J.W.; Zhang, X.D.; Tang, J.W.; Zhao, Y.; Liu, S.-L.; Zhao, Y.; Zhang, N.; Wang, D.; Ye, L.; Chen, X.; et al. Rapid Prediction of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* through Deep Learning Analysis of SERS Spectra. *Microbiol. Spectr.* **2023**, *11*, e0412622. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Anexo 2 – Resumos aceitos em congresso.

RUBENS, R. S.; ARRUDA, I.; DALMOLIN, T. V. Resistência à antimicrobianos em pacientes pediátricos hospitalizados. In: SIMPÓSIO INPRA 2024, 2024. Anais Simpósio INPRA 2024, 2024.

ARRUDA, I.; RUBENS, R. S.; DALMOLIN, T. V. ÁGAR SPOT E DROP TEST: ALTERNATIVAS PARA DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B EM ENTEROBACTERALES. In: SIMPÓSIO INPRA 2024, 2024. Anais Simpósio INPRA 2024.

Anexo 3 – Trabalhos publicados em colaboração não relacionados ao projeto da dissertação

Silva Machado, Gabrielly; Siqueira Rubens, Rebeca; Vendruscolo Dalmolin, Tanise. Abordagem *One Health* (Saúde Única) e a dengue. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, v. 11, p. 1, 2023.