



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Atividade antibacteriana do canabidiol: potencial
reposicionamento e combinação com polimixina B contra
bactérias multidroga-resistentes**

Nathália de Lima Martins Abichabki

**Ribeirão Preto
2022**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Atividade antibacteriana do canabidiol: potencial reposicionamento e combinação com polimixina B contra bactérias multidroga-resistentes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientada: Nathália de Lima Martins Abichabki

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Neves de Andrade

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 18/01/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2022

ABICHABKI,
N. L. M.

**Atividade antibacteriana do canabidiol: potencial
reposicionamento e combinação com polimixina B contra
bactérias multidroga-resistentes**

Espaço de 2,5
cm reservado
para etiqueta de
localização da
biblioteca

MESTRADO
FCFRPUSP
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Abichabki, Nathália de Lima Martins

Atividade antibacteriana do canabidiol: potencial reposicionamento e combinação com polimixina B contra bactérias multidroga-resistentes.

Ribeirão Preto, 2022.

70 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientador: Andrade, Leonardo Neves de

1. Resistência bacteriana. 2. Antibióticos. 3. Combinações de fármacos. 4. Canabidiol. 5. Polimixina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathália de Lima Martins Abichabki

Atividade antibacteriana do canabidiol: potencial reposicionamento e combinação com polimixina B contra bactérias multidroga-resistentes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Neves de Andrade

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios de pesquisa:

Laboratório de Pesquisa em Resistência e Virulência Bacteriana (LabReVi), do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob coordenação e orientação do Prof. Dr. Leonardo Neves de Andrade.

Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular (LEBEM), do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob colaboração e coordenação da Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia da Costa Darini.

Laboratório de Pesquisa em Tuberculose, do Departamento de Ciências Biológicas (DCB), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Araraquara – SP, sob colaboração e coordenação do Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan.

Dedicatória

Ao Laboratório de Pesquisa em Resistência e Virulência Bacteriana

(LabReVi)

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Leonardo Andrade, pela orientação, confiança, conselhos, críticas, apoio e incentivo, tão importantes para meu crescimento científico, profissional e pessoal. Obrigada pelo exemplo e inspiração! Muito obrigada pela oportunidade de fazer parte do LabReVi!

À Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Darini, pela oportunidade de realizar parte dos meus experimentos no LEBEM e por todos os conselhos, sugestões e revisões de manuscritos, além de todos os ensinamentos desde a graduação.

Aos Professores Dr. Antônio Zuardi, Dr. Jaime Hallak e Dr. José Alexandre Crippa, pelo apoio e incentivo durante todo o trabalho.

À Tânia Ogasawara, por todo apoio, ajuda, suporte técnico e amizade.

À Luísa Zacharias, pela colaboração nos experimentos, parceria e amizade.

À Natália Columbaro e Joseane Ferreira, pela colaboração nos experimentos e amizade.

Prof. Dr. Fernando Bellissimo Rodrigues, pela colaboração e pelas discussões clínicas e científicas.

À Prof^a. Dr^a. Vera Lanchote, Dr^a Fernanda Moreira e Jhohann Benzi, pela colaboração em discussões sobre farmacocinética.

Prof. Dr. Fernando Pavan e Camila Ribeiro, pela colaboração em experimentos com *Mycobacterium tuberculosis*.

Ao Prof. Dr. Gilberto Braga e Dr. Guilherme Brancini, pela colaboração na análise dos dados e discussões científicas.

Ao Prof. Dr. Leonardo Pereira, pela colaboração e discussões científicas.

Ao Dr. Rafael Cantón, pela colaboração e discussões científicas.

Ao Prof. Dr. Valdes Bolella, Dr. Gilberto Gaspar, Dr. Roberto Martinez, Renata Pocente, Natália Augusta e Leila Franco, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP); Jussara Palmeiro, da Universidade Federal de Santa Catarina; Libera Maria Dalla-Costa, do Instituto de Pesquisas Pequeno Príncipe; Prof. Dr. Nilton Lincopan, do Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo; Prof. Dr. Marcelo Baruffi, da FCFRP-USP; e FIOCRUZ, por fornecerem isolados clínicos estudados nesse trabalho.

Aos professores da FCFRP-USP, Prof^ª. Dr^ª. Maria Regina Torqueti, Prof^ª. Dr^ª. Márcia Kress, Prof. Dr. Marcelo Baruffi, Prof^ª. Dr^ª. Andreia Leopoldino e Prof. Dr. Norberto Lopes; e à Dr^ª. Samanta Almeida, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, SP, pelo suporte técnico laboratorial.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia (PPG-BBio), pela estrutura e oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Aos funcionários do PPG-BBio, ao Serviço de Pós-Graduação e à Comissão de Pós-Graduação, pelo apoio administrativo e contribuição durante todo o Curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Processo 88887.369851/2019-00, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos colegas da pós-graduação, em especial Luísa Zacharias, Natália Columbaro, Bianca Leite e Vitor Bassan, pela amizade, apoio e incentivo.

Aos meus pais, Marcelo e Rita, e à minha irmã, Amanda, por todo apoio e incentivo de sempre.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Le hasard ne favorise que les esprits préparés”

“O acaso favorece somente as mentes preparadas”

Louis Pasteur

RESUMO

ABICHABKI, N. L. M. **Atividade antibacteriana do canabidiol: potencial reposicionamento e combinação com polimixina B contra bactérias multidroga-resistentes.** 2022. 70f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema de saúde pública mundial, especialmente devido ao crescente aumento de infecções relacionadas à assistência à saúde causadas por bactérias multidroga-resistentes (MDR) e extremamente droga-resistentes (XDR). Com o objetivo de combater a resistência bacteriana aos antibióticos, muitas substâncias têm sido investigadas quanto à sua potencial atividade antibacteriana, incluindo substâncias provenientes de produtos naturais. O canabidiol (CBD) é o canabinoide não psicoativo mais abundante isolado da *Cannabis sativa* e o CBD tem sido associado a múltiplas e potenciais atividades biológicas e terapêuticas. Este estudo teve como objetivo investigar (i) a atividade antibacteriana do CBD ultrapuro e (ii) a atividade antibacteriana da combinação CBD + polimixina B (PB) contra bactérias gram-negativas, incluindo bacilos gram-negativos (BGN) resistentes à PB. Foi utilizado o método referência de microdiluição de caldo, técnica de *checkerboard* e ensaio de *time-kill*. O CBD apresentou atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas (13 espécies, 21 linhagens), diplococos gram-negativos (GND) que expressam lipo-oligossacarídeo (LOS) (*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*) e *Mycobacterium tuberculosis*, mas não contra BGN (27 espécies, 70 linhagens). Para a maioria dos BGN estudados, os resultados mostraram que baixas concentrações de PB ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$ e menores que a concentração inibitória mínima) permitiram que o CBD ($\leq 4 \mu\text{g/mL}$) exercesse atividade antibacteriana contra BGN (por exemplo, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*), incluindo BGN com resistência cromossômica à PB (por exemplo, *K. pneumoniae* com mutação no gene *mgrB*) e *E. tarda*, com resistência intrínseca à PB. As exceções foram *Pseudomonas aeruginosa* e linhagens de *E. coli* com resistência à colistina mediada por plasmídeo (MCR-1), para as quais a combinação CBD + PB foi antibacteriana somente na presença de *Phe-Arg β -naphthylamide dihydrochloride* (PA β N). A combinação CBD + PB também apresentou efeito aditivo e/ou sinérgico contra DGN que expressam LOS. Os resultados dos ensaios de *time-kill* mostraram que a combinação CBD + PB levou a uma maior redução no número de unidades formadoras de colônias por mililitro em comparação com CBD e PB sozinhos, nas mesmas concentrações usadas em combinação, e a combinação CBD + PB foi sinérgica para todos os quatro isolados de *K. pneumoniae* resistentes à PB avaliados. Os resultados obtidos mostram potencial translacional e o CBD deve ser mais explorado quanto ao reposicionamento como antibacteriano por meio de ensaios clínicos. A eficácia antibacteriana da combinação CBD + PB contra BGN MDR e XDR, destacando *K. pneumoniae* resistente à PB, é particularmente promissora.

Palavras-chave: polimixinas, canabinoides, concentração inibitória mínima (CIM), concentração antibiótica de efeito mínimo (CAEM), lipopolissacarídeo (LPS), lipo-oligossacarídeo (LOS), farmacocinética, superbactérias, *Enterobacterales*, *Klebsiella pneumoniae*, *time-kill*, atividade sinérgica.

ABSTRACT

ABICHABKI, N. L. M. **Cannabidiol antibacterial activity: potential repurposing and combination with polymyxin B against multidrug-resistant bacteria.** 2022. 70f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Bacterial resistance to antibiotics is a worldwide public health problem, especially due to the continuous increase of healthcare-related infections caused by multidrug-resistant (MDR) and extremely drug-resistant (XDR) bacteria. In order to combat bacterial resistance to antibiotics, many substances have been investigated regarding their potential antibacterial activity, including substances from natural products. Cannabidiol (CBD) is the most abundant non-psychoactive cannabinoid isolated from *Cannabis sativa* and CBD has been associated with multiple potential biological and therapeutic activities. This study aimed to investigate (i) the ultrapure CBD antibacterial activity, and (ii) the antibacterial activity of the combination CBD + polymyxin B (PB) against Gram-negative bacteria, including PB-resistant Gram-negative bacilli (GNB). We used the standard broth microdilution method, checkerboard assay, and time-kill assay. CBD exhibited antibacterial activity against Gram-positive bacteria (13 species, 21 strains), lipooligosaccharide (LOS)-expressing Gram-negative diplococcus (GND) (*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*), and *Mycobacterium tuberculosis*, but not against GNB (27 species, 70 strains). For most of the GNB studied (8/13 species; 47/52 strains), our results showed that low concentrations of PB ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$ and lower than minimal inhibitory concentration) allowed CBD ($\leq 4 \mu\text{g/mL}$) to exert antibacterial activity against GNB (e.g., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*), including chromosomal-acquired PB-resistant GNB (e.g. *K. pneumoniae mgrB* mutation) and intrinsic PB-resistant *E. tarda*. The exceptions were *P. aeruginosa* strains and plasmid-mediated colistin resistant (MCR-1) *E. coli*, against which the combination CBD + PB was antibacterial only in the presence of *Phe-Arg* β -naphthylamide dihydrochloride (PA β N). CBD + PB also showed additive and/or synergistic effect against LOS-expressing GND. Time-kill assays results showed that the combination CBD + PB led to a greater reduction in the number of colony-forming units per milliliter compared to CBD and PB alone, at the same concentration used in combination, and the combination CBD + PB was synergistic for all four PB-resistant *K. pneumoniae* isolates evaluated. Our results show translational potential, and CBD should be further explored as a potential antibacterial agent (for drug repurposing) by clinical trials. The antibacterial efficacy of the combination CBD + PB against MDR and XDR GNB, highlighting PB-resistant *K. pneumoniae*, is particularly promising.

Keywords: polymyxins, cannabinoid, minimal inhibitory concentration (MIC), minimal effective antibiotic concentration (MEAC), lipopolysaccharide (LPS), lipooligosaccharide (LOS), pharmacokinetic, superbugs, *Enterobacterales*, *Klebsiella pneumoniae*, time-kill, synergistic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do CBD	4
Figura 2. Representação do ensaio de microdiluição em caldo para avaliação da atividade antibacteriana do CBD	11
Figura 3. Representação da triagem, por microdiluição em caldo, da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB com concentração fixa de CDB (256 µg/mL)	14
Figura 4. Representação da triagem, por microdiluição em caldo, da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB na presença de PAβN	15
Figura 5. Representação da confirmação, por <i>checkerboard</i> , da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB	16
Figura 6. Resultados de CIM de CBD contra <i>S. aureus</i> ATCC 29213 quando utilizado meio de cultura CMH e MH-F	27
Figura 7. Atividade antibacteriana da combinação CBD + PB, CBD + PB + PAβN e CBD + PAβN contra <i>E. coli</i> ATCC 25922	29
Figura 8. Atividade antibacteriana da combinação CBD + PB + PAβN contra <i>P. aeruginosa</i> sensível à PB e isolado clínico de <i>E. coli</i> com resistência à PB mediada por plasmídeo (MCR-1)	32
Figura 9. Resultado representativo de <i>checkerboard</i> para confirmação da atividade antibacteriana da combinação CBD+PB contra <i>K. pneumoniae</i> L8	37
Figura 10. Comparação dos resultados de <i>checkerboard</i> de CBD + PB contra <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, na ausência e presença de PAβN (50 µg/mL)	38
Figura 11. Resultados de <i>checkerboard</i> para confirmação da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB contra <i>Moraxella catarrhalis</i>	40
Figura 12. Resultados de <i>checkerboard</i> para confirmação da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB contra <i>Neisseria meningitidis</i>	41

Figura 13. Resultados de checkerboard para confirmação da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB contra <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	42
Figura 14. Gráficos representativos da dinâmica de inibição do crescimento/morte bacteriano, a partir dos experimentos de <i>time-kill</i>	44
Figura 15. Representação esquemática da atividade da CIM de PB e da CAEM de PB	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. CIM de CBD contra as linhagens bacterianas estudadas	21
Tabela 2. Concentrações antibióticas de efeito mínimo (CAEM) de PB necessárias para a atividade antibacteriana da combinação CBD (256 µg/mL) + PB, em comparação à CIM de PB para cada linhagem avaliada na triagem da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB	30
Tabela 3. Concentrações antibióticas de efeito mínimo (CAEM) de PB na combinação CBD (256 µg/mL) + PB + PAβN (50 µg/mL)	34
Tabela 4. Mínimas concentrações de CBD e PB (CAEM de PB) para a atividade antibacteriana da combinação CBD + PB, a partir dos resultados de <i>checkerboard</i>	36
Tabela 5. Mínimas concentrações de CBD e PB (CAEM de PB) para a atividade antibacteriana da combinação CBD + PB contra DGN, a partir dos resultados de <i>checkerboard</i> , além do ICIF calculado e efeito resultante da combinação	39
Tabela 6. Diferença entre log ₁₀ UFC/mL após atividade da combinação CBD + PB e após atividade da CAEM de PB, a partir dos experimentos de <i>time-kill</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β-NAD	β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo
ADC	Albumina, dextrose, catalase
AMH	Ágar Mueller Hinton
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BGN	Bacilos gram-negativos
BrCAST	Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos
CAEM	Concentração Antibiótica de Efeito Mínimo
CBD	Canabidiol
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL	Clearance
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMH	Caldo Mueller Hinton
CPE	Carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i>
CRAB	Carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>
CRE	Carbapenem-resistant <i>Enterobacterales</i>
CRPA	Carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Css	Concentração plasmática no estado de equilíbrio
CTX-M	Beta-lactamase ativa em cefotaxima, isolada pela primeira vez em Munich
DGN	Diplococos gram-negativos
ESBL	Beta-lactamase de espectro ampliado
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
hVISA	Heterogeneous vancomycin intermediate resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
IV	Intravenosa
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LOS	Lipo-oligossacarídeo

LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	Multidroga-resistente
MH-F	Caldo Mueller Hinton suplementado com sangue lisado de cavalo e β -NAD
mL	Mililitro
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NDM	New Delhi metallo-beta-lactamase
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrose, catalase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
PA β N	Phe-Arg β -naphthylamide dihydrochloride
PB	Polimixina B
PD	Farmacodinâmica
PDR	Pandroga-resistente
PK	Farmacocinética
SHV	Sulfhydryl reagent variable
SPM	São Paulo Metallo-beta-lactamase
ST	Sequence Type
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
VISA	Vancomycin intermediate resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	Vancomycin intermediate resistant <i>Enterococcus</i>
VRSA	Vancomycin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
XDR	Extremamente droga-resistentes

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca Registrada
β	Beta
μL	Microlitros
°C	Graus Celsius
τ	Cepa-tipo
T	Intervalo de tempo

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
Lista de símbolos	viii
1. Introdução	1
1.1. Resistência bacteriana aos antibióticos	1
1.2. Resistência à Polimixina B	1
1.3. Combate à resistência bacteriana a antibióticos	2
1.3.1. Canabidiol	3
1.3.2. Terapias baseadas em combinações	5
2. Objetivos	8
2.1. Objetivo geral	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. Materiais e Métodos	10
3.1. Materiais	10
3.2. Investigação da atividade antibacteriana do CBD contra bactérias gram-positivas e gram-negativas	10
3.3. Investigação da atividade antibacteriana do CBD contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
3.4. Avaliação da atividade antibacteriana do CBD contra bactérias gram-positivas e gram-negativas na presença de inibidores de bombas de efluxo	13
3.5. Investigação da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB contra bactérias gram-negativas	13
3.5.1. Triagem por microdiluição em caldo com concentração fixa de CDB (256 µg/mL)	13
3.5.2. Triagem por microdiluição em caldo na presença de PAβN	14
3.5.3. Confirmação por <i>checkerboard</i>	15
3.5.4. Avaliação por <i>time-kill</i>	18
4. Resultados	20
4.1. Atividade antibacteriana do CBD	20
4.2. Atividade antibacteriana da combinação CBD + PB	28
4.2.1. Triagem por microdiluição em caldo com concentração fixa de CDB (256 µg/mL)	28

4.2.2. Confirmação por <i>checkerboard</i>	35
4.2.3. Resultados dos ensaios de <i>time-kill</i>	43
5. Discussão.....	47
5.1. Atividade antibacteriana do CBD	47
5.2. Atividade antibacteriana da combinação CBD + PB	50
5.3. Atividade biológica da combinação CBD + PB.....	51
5.4. Perspectivas farmacocinéticas do reposicionamento do CBD como antibacteriano.....	56
5.5. Perspectivas clínicas do reposicionamento do CBD como antibacteriano.....	58
6. Conclusões	61
7. Referências	63

Introdução

1. Introdução

1.1. Resistência bacteriana aos antibióticos

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema de saúde pública mundial, especialmente devido à crescente incidência de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) causadas por bactérias multidroga-resistentes (MDR) e extremamente droga-resistentes (XDR). Em grande parte dos casos, essas infecções são causadas pelos patógenos do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.), além de *Escherichia coli* (MAGIORAKOS et al., 2012; PENDLETON; GORMAN; GILMORE, 2013).

Bacilos gram-negativos (BGN) resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro, como cefalosporinas de terceira e quarta gerações e/ou carbapenêmicos, têm sido de preocupação especial: BGN produtores de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL, do inglês *extended spectrum beta-lactamase*), *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (CRE, do inglês *carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*, como *K. pneumoniae* produtora de KPC), *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB, do inglês *carbapenem-resistant A. baumannii*), *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (CRPA, do inglês *carbapenem-resistant P. aeruginosa*) e isolados resistentes a ceftazidima-avibactam e/ou ceftalozana-tazobactam (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017; TAMMA et al., 2021). Geralmente essas bactérias também apresentam resistência a antibióticos não-beta-lactâmicos, como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tigeciclina, entre outros, demonstrando fenótipo de MDR/XDR.

Neste contexto, antibióticos como as polimixinas (polimixina B e E) têm sido utilizados na prática clínica, muitas vezes, como último recurso terapêutico no tratamento de infecções graves causadas por BGN MDR/XDR. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

1.2. Resistência à Polimixina B

A atividade antibacteriana das polimixinas é, principalmente, resultante da interação eletrostática entre a molécula de polimixina positivamente carregada com os grupos fosfatos negativamente carregados do lipídeo A presente no lipopolissacarídeo (LPS) ou lipo-oligossacarídeo (LOS), da membrana externa de bactérias gram-negativas. Desta forma, o LPS ou LOS é desestabilizado, resultando

na ruptura do envelope celular (NANG et al., 2021; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

No entanto, a resistência adquirida às polimixinas, cromossômica ou plasmideal, tem sido crescentemente detectada em BGN, incluindo espécies da ordem *Enterobacterales* (como *K. pneumoniae*) e BGN não-fermentadores da glicose (como *A. baumannii* e *P. aeruginosa*).

O principal mecanismo de resistência às polimixinas é a adição dos grupos catiônicos ao lipídeo A, conferindo cargas positivas ou neutras e levando à repulsão da molécula de PB (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

Diversos genes e operons estão envolvidos na modificação do LPS. Na maioria das espécies bacterianas, mutações em genes cromossômicos regulatórios levam à ativação de sistemas de dois componentes e à transcrição de genes e operons, o que resulta na síntese de fosfoetanolamina e/ou 4-amino-4-deoxi-L-arabinose, posteriormente adicionados ao lipídeo A ou a outras porções do LPS (BARON et al., 2016; NANG et al., 2021; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

Além da resistência cromossômica, a resistência às polimixinas pode ser mediada por plasmídeo (*mcr*, do inglês *plasmid-mediated colistin resistance*). A aquisição de genes *mcr* resulta na produção da proteína MCR, enzima da família das fosfoetanolaminas transferases que leva à adição de fosfoetanolamina ao lipídeo A (BARON et al., 2016; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

1.3. Combate à resistência bacteriana a antibióticos

Diversas abordagens têm sido utilizadas para compreender melhor e combater mais eficientemente a resistência bacteriana aos antibióticos. Essas abordagens incluem: o desenvolvimento de testes fenotípicos e moleculares para detecção de mecanismos de resistência; a investigação molecular de genes, plasmídeos e linhagens bacterianas resistentes; terapias com bacteriófagos; e a pesquisa de compostos anti-virulência e de novas moléculas com atividade antimicrobiana (PACIOS et al., 2020; THEURETZBACHER et al., 2019, 2020; VAN BELKUM et al., 2020). Outras estratégias estão relacionadas ao gerenciamento da antibioticoterapia (*stewardship*), que pode envolver a otimização de farmacocinética e farmacodinâmica (PK/PD), monitorização terapêutica e ajuste de dose de antimicrobianos, visando a redução e o uso racional de antibióticos (RICE, 2018; VAN BELKUM et al., 2020).

Considerando o aumento do número de infecções causadas por bactérias multirresistentes, a Organização Mundial da Saúde (OMS) chama atenção para a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos antibióticos contra patógenos ESKAPE MDR/XDR (TACCONELLI et al., 2018). No entanto, a descoberta de uma nova substância antimicrobiana é tarefa laboriosa e é seguida de avaliações pré-clínicas, clínicas e regulamentações governamentais antes de ser aprovada como um novo fármaco, demandando considerável tempo da descoberta até a utilização clínica (ÅRDAL et al., 2019; THEURETZBACHER et al., 2019, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Entretanto, é entusiasmante a investigação de novos antimicrobianos de origem da natureza, dada a grande biodiversidade do Planeta Terra como fonte natural de novas moléculas (por exemplo, de origem de plantas e outros micro-organismos).

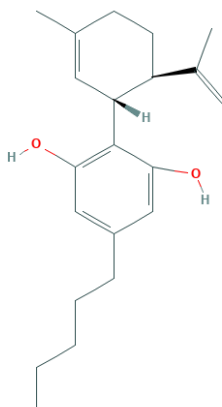
O reposicionamento de fármacos, ou seja, nova indicação terapêutica para medicamentos já utilizados para outros fins, pode representar uma abordagem mais rápida no processo de desenvolvimento de novos antimicrobianos, pois parâmetros pré-clínicos e clínicos desses fármacos já estão estabelecidos, otimizando novos estudos com objetivo de utilização terapêutica como antimicrobiano (DAS; DASGUPTA; CHOPRA, 2016; KAUL et al., 2019; ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018).

1.3.1. Canabidiol

No cenário de combate à resistência bacteriana aos antibióticos, muitas substâncias têm sido investigadas quanto à sua potencial atividade antibacteriana, incluindo substâncias provenientes de produtos naturais.

O canabidiol (CBD) (Figura 1) é o canabinoide não psicoativo mais abundante dentre os mais de 400 compostos isolados da *Cannabis sativa*, a qual apresenta grande diversidade de substâncias bioativas de potencial medicinal.

Figura 1. Estrutura química do CBD



Fonte: Pubchem (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2021)

CBD tem sido associado a múltiplas e potenciais atividades biológicas, com destaque para suas propriedades ansiolíticas e antipsicóticas, anti-inflamatórias, analgésicas, antioxidantes e neuroprotetoras (CASSANO et al., 2020; CRIPPA et al., 2018; LUCAS; GALETTIS; SCHNEIDER, 2018; STASIŁOWICZ et al., 2021; VALIM BRIGANTE et al., 2018; ZUARDI et al., 2012). Foi relatado, ainda, potencial do CBD como inibidor da proliferação de células cancerígenas (GUZMÁN, 2003; SULTAN; MARIE; SHEWEITA, 2018).

Desde a década de 1950, preparações à base de *C. sativa* têm sido investigadas quanto à sua atividade antimicrobiana (APPENDINO et al., 2008; KABELIK, 1957; KREJCI, 1958; VAN KLINGEREN; TEN HAM, 1976). Porém, os primeiros estudos não avaliaram os compostos purificados, mas obtidos a partir de extratos. Além disso, poucos estudos demonstram a atividade antibacteriana do CBD ultrapuro contra bactérias gram-positivas e a ausência de atividade contra BGN (ABICHABKI et al., 2020, 2021; ANDRADE et al., 2018; APPENDINO et al., 2008; BLASKOVICH et al., 2021; CASSANO et al., 2020; FARHA et al., 2020; MARTINENGHI et al., 2020; VAN KLINGEREN; TEN HAM, 1976).

Outras atividades biológicas do CBD frente bactérias também já foram descritas, como inibição da liberação de vesículas de membrana externa de BGN, inibição da formação de biofilmes e erradicação de biofilmes pré-formados (BLASKOVICH et al., 2021; KOSGODAGE et al., 2019).

Em 2018, a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA, Estados Unidos) aprovou o CBD (Epidiolex®, Greenwich Biosciences, Inc.) para o

tratamento de pacientes com síndrome de Lennox-Gastaut ou síndrome de Dravet (U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020). Da mesma forma, na União Europeia, o CBD Epidyolex® (GW Pharma [Internacional] B.V.) foi autorizado pela Agência Europeia de Medicamentos em 2019 para a mesma indicação terapêutica quando combinado ao clobazam, outro medicamento antiepiléptico (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2019). Em 2020, a Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o CBD (Canabidiol Prati-Donaduzzi®, Toledo, PR, Brasil) para o tratamento da epilepsia farmacorresistente ou epilepsia refratária (ANVISA, 2020). Recentemente, em 2021, a ANVISA publicou a autorização sanitária também de uma solução de uso oral à base de CBD, com indicação e a forma de uso de responsabilidade do médico prescritor (ANVISA, 2021).

1.3.2. Terapias baseadas em combinações

As terapias baseadas em combinações são também apontadas como alternativas promissoras no combate à resistência bacteriana aos antibióticos. A atividade antibacteriana contra bactérias MDR/XDR pode ser resultante da combinação entre dois diferentes antibióticos, entre antibiótico e um peptídeo antimicrobiano, entre antibiótico e nanopartículas e, ainda, antibiótico e fármacos não-antimicrobianos (CHENG; WILLIAMSON; ZHENG, 2019; PACIOS et al., 2020; SCHNEIDER et al., 2017; YU et al., 2020).

Como resultados da combinação entre substâncias, podem ser observados efeitos sinérgicos, aditivos, indiferentes ou antagônicos (DOERN, 2014; SULLIVAN et al., 2020). Combinações com efeitos sinérgicos podem ser alternativas terapêuticas promissoras no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos, frente as quais altas concentrações de antibióticos seriam necessárias para a inibição do crescimento bacteriano. Efeitos sinérgicos são observados quando a combinação resulta em maior inibição bacteriana em comparação à atividade antibacteriana de cada substância individualmente (SULLIVAN et al., 2020).

Desta forma, combinações com atividade antibacteriana possibilitam melhorar a atividade antibacteriana de antibióticos, permitindo o uso em menores doses de cada um dos fármacos e minimizando toxicidade. Adicionalmente, combinações de permitem a inibição de mecanismos de resistência (por exemplo, inibidores de beta-lactamases combinados a antibióticos beta-lactâmicos) ou mesmo a atividade de uma substância que não teria atividade por não atingir o alvo na célula

bacteriana (por exemplo, devido à impermeabilidade) (SULLIVAN et al., 2020; ZHU et al., 2021).

Além da atividade inibitória, antibióticos podem ainda exercer outros efeitos na célula bacteriana, por exemplo, em concentrações subletais. Neste contexto, a concentração antibiótica de efeito mínimo (CAEM), definida como a mínima concentração subletal que produz qualquer efeito na célula bacteriana (por exemplo, desestabilização da membrana externa de bactérias gram-negativas, porém, sem inibição, sem morte bacteriana), poderia permitir ou melhorar a atividade de outra substância e fazer com que a combinação tenha atividade antibacteriana (BAQUERO et al., 2021; BAQUERO; COQUE, 2014; YIM; HUIMI WANG; DAVIES, 2006).

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar a atividade antibacteriana do canabidiol (CBD) *in vitro* assim como da combinação de CBD com polimixina B (PB), contra bactérias sensíveis e resistentes a antibióticos, incluindo linhagens resistentes à PB.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar a atividade antibacteriana do CBD *in vitro* contra ampla diversidade de bactérias gram-positivas e gram-negativas e contra *Mycobacterium tuberculosis*.
- Avaliar se a presença de inibidores de bombas de efluxo interfere na atividade antibacteriana do CBD *in vitro* contra bacilos gram-negativos (BGN).
- Investigar se a combinação CBD + PB tem atividade antibacteriana *in vitro* contra bactérias gram-negativas sensíveis e resistentes à PB, incluindo cepas padrão e isolados clínicos.
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da combinação CBD + PB contra BGN na presença de *Phe-Arg β -naphthylamide dihydrochloride* (PA β N).
- Avaliar a dinâmica de inibição/morte bacteriana pela combinação CBD + PB ao longo do tempo.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Para os experimentos realizados neste trabalho, foi utilizado meio de cultura Caldo Mueller Hinton II Broth (Cation-Adjusted, 212322) (Becton, Dickinson and Company, BBL) (CMH) para a maioria das bactérias do estudo. Para as bactérias fastidiosas, como *Streptococcus* spp., *Neisseria* spp., *Moraxella catarrhalis* e *Haemophilus influenzae*, foi utilizado Caldo Mueller Hinton II Broth (Cation-Adjusted, 212322) (Becton, Dickinson and Company, BBL) suplementado com sangue lisado de cavalo e β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo (β -NAD) (Caldo MH-F), de acordo com as recomendações do EUCAST/BrCAST (BRCAST, 2021a, 2021b; EUCAST, 2020).

Foi utilizado CBD ultrapuro (99.6%; BSPG-Pharm, Sandwich, UK), solubilizado em metanol. Padronizações prévias em no Laboratório de Pesquisa em Resistência e Virulência Bacteriana (LabReVi) mostraram que o metanol não é antibacteriano nas concentrações (variando entre 0,006 e 327,68 μ L/mL em CMH) utilizadas para solubilização do CBD neste estudo.

Foi utilizada polimixina B (United States Pharmacopeia) solubilizada em água.

Foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 poços, não tratadas, com fundo em “U”.

3.2. Investigação da atividade antibacteriana do CBD contra bactérias gram-positivas e gram-negativas¹

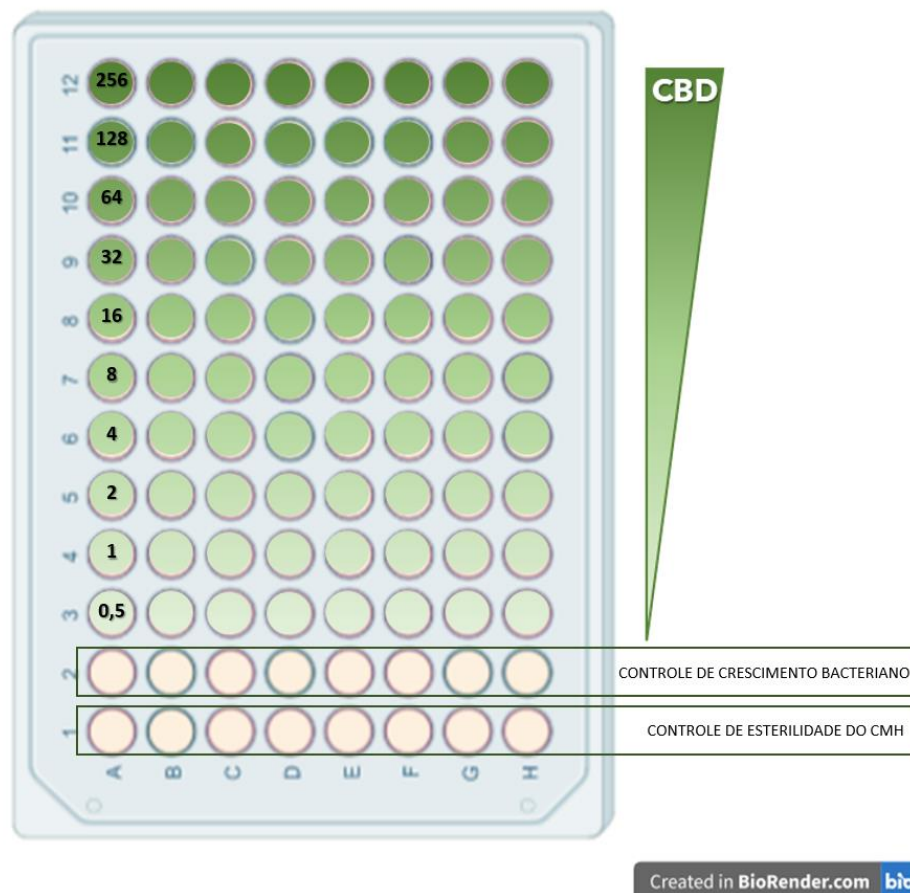
A atividade antibacteriana do CBD foi investigada contra ampla diversidade de espécies bacterianas, compreendendo bactérias gram-positivas (13 diferentes espécies, 21 linhagens) e gram-negativas (30 diferentes espécies, 73 linhagens), e incluindo cepas-tipo, linhagens controle de qualidade e isolados clínicos (linhagens MDR e XDR, clones internacionais de alto risco e linhagens sensíveis) (Tabela 1).

A investigação da atividade antibacteriana do CBD (256 – 0,5 μ g/mL) foi realizada por microdiluição em caldo, que é o método referência para avaliação e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de antibióticos frente bactérias,

¹ Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP: CAAE: 48834921.9.0000.5403 – Protocolo CEP/FCFRP nº580, conforme Parecer Consubstanciado nº 4.952.703

assim como para a pesquisa de novos fármacos antimicrobianos, seguindo a padronização recomendada (EUCAST, 2021a) (Figura 2).

Figura 2. Representação do método de microdiluição em caldo para avaliação da atividade antibacteriana do CBD



Fonte: Autoria própria. Elaborado em BioRender.com.

Os números em negrito representam as concentrações de CBD em cada poço, após diluição seriada 1:2.

PB (512 – 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e vancomicina (256 – 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram utilizadas como controles para as bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente. Além disso, foram utilizadas ciprofloxacina (4 – 0,005 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como controle para diplococos gram-negativos (GND) (*Neisseria spp.*, *M. catarrhalis*), e ampicilina (4 – 0,005 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para *S. pneumoniae* e *H. influenzae* (EUCAST, 2021b). Foram também utilizadas bactérias padrão para controle de qualidade da técnica, conforme recomendações do BrCAST. Os valores de CIM dos antibióticos utilizados como controles foram obtidos dentro da faixa esperada (BRCAS, 2021c, 2021b). Os ensaios foram realizados em réplicas técnicas e experimentais.

Além da avaliação visual da inibição do crescimento bacteriano, os resultados também foram avaliados após a adição de 30 µL de resazurina (*7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide sodium salt*) (Sigma-Aldrich Co. LLC.) 0,02% em cada poço da microplaca, com incubação por 30-60 minutos para BGN e bactérias gram-positivas ou 60-120 minutos para diplococos gram-negativos (DGN) e enterococos. A resazurina é um corante azul que, na presença de células metabolicamente ativas, é reduzido à resofurina, que apresenta cor rosa fluorescente. Assim, pode ser utilizada na investigação da resposta biológica a uma substância, de modo que as células bacterianas viáveis serão responsáveis pela redução da resazurina, resultando na coloração rosa, enquanto o meio de cultura com células bacterianas cujo crescimento foi inibido pela substância permanece com a coloração azul (FOERSTER et al., 2017; LESCAT et al., 2019). Este passo adicional teve como objetivo a melhor visualização da atividade antibacteriana do CBD.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi também verificada para cocos gram-positivos (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e ATCC 51299, *E. faecium* NCTC 7171 e ATCC 51559 e *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 700699) e para DGN (*N. meningitidis* ATCC 13077, *N. gonorrhoeae* ATCC 19424, and *M. catarrhalis* ATCC 25238), bactérias de importância clínica frente as quais CBD foi antibacteriano. A CBM foi avaliada por semeadura (repique) dos poços testes para meio de cultura sólido apropriado (ágar Mueller Hinton [AMH] ou, para bactérias fastidiosas, ágar sangue ou chocolate), na ausência de CBD.

3.3. Investigação da atividade antibacteriana do CBD contra *Mycobacterium tuberculosis*

A atividade antibacteriana do CBD também foi investigada contra *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), bem como contra *M. tuberculosis* CF86 (isolado clínico MDR, resistente à rifampicina e isoniazida).

Foi utilizada microdiluição em caldo, para determinar a CIM de CBD (100 – 0,391 µg/mL), conforme recomendado (EUCAST, 2021c). Foi utilizado meio de cultura caldo Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% OADC (ácido oleico, albumina, dextrose, catalase) e glicerol 0,4%. Os antibióticos rifampicina e isoniazida foram utilizados como controles (1 – 0,004 µg/mL). Neste experimento, foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato. As placas foram incubadas por sete dias, a 37°C e 5% CO₂. Após incubação, foi adicionada solução

aquosa de resazurina 0,01% a cada poço da microplaca e, após 24 horas, a CIM de CBD foi determinada pela leitura da fluorescência (530/590 nm) (PALOMINO et al., 2002).

3.4. Avaliação da atividade antibacteriana do CBD contra bactérias gram-positivas e gram-negativas na presença de inibidores de bombas de efluxo

A atividade antibacteriana do CBD, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, também foi investigada na presença de inibidores de efluxo para avaliar a possível extrusão do CBD através de bombas de efluxo. Foram avaliados BGN do grupo ESKAPE (*K. pneumoniae* ATCC 13883, *A. baumannii* ATCC 19606, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. cloacae* ATCC 13047), assim como *E. coli* ATCC 25922 e *E. coli* 72H (isolado clínico com resistência à polimixina mediada por plasmídeo [MCR-1]) e *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637.

Foi utilizada a microdiluição do caldo para determinar a CIM de CBD na presença e na ausência de *Phe-Arg β-naphthylamide dihydrochloride* (PAβN) (Sigma-Aldrich) (50 µg/mL), reserpina (Sigma-Aldrich) (50 µg/mL), e curcumina (256 µg/mL), em diferentes ensaios (SUNDARAMOORTHY; SIVASUBRAMANIAN; NAGARAJAN, 2020; Y. MAHMOOD et al., 2016). A redução de pelo menos 3 diluições seriadas 1:2 no valor da CIM de CBD, na presença de inibidores de bomba de efluxo, seria sugestiva de resistência ao CBD mediada por efluxo.

A etapa colorimétrica utilizando a solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) também foi realizada com o objetivo de melhor visualização da atividade antibacteriana da CBD.

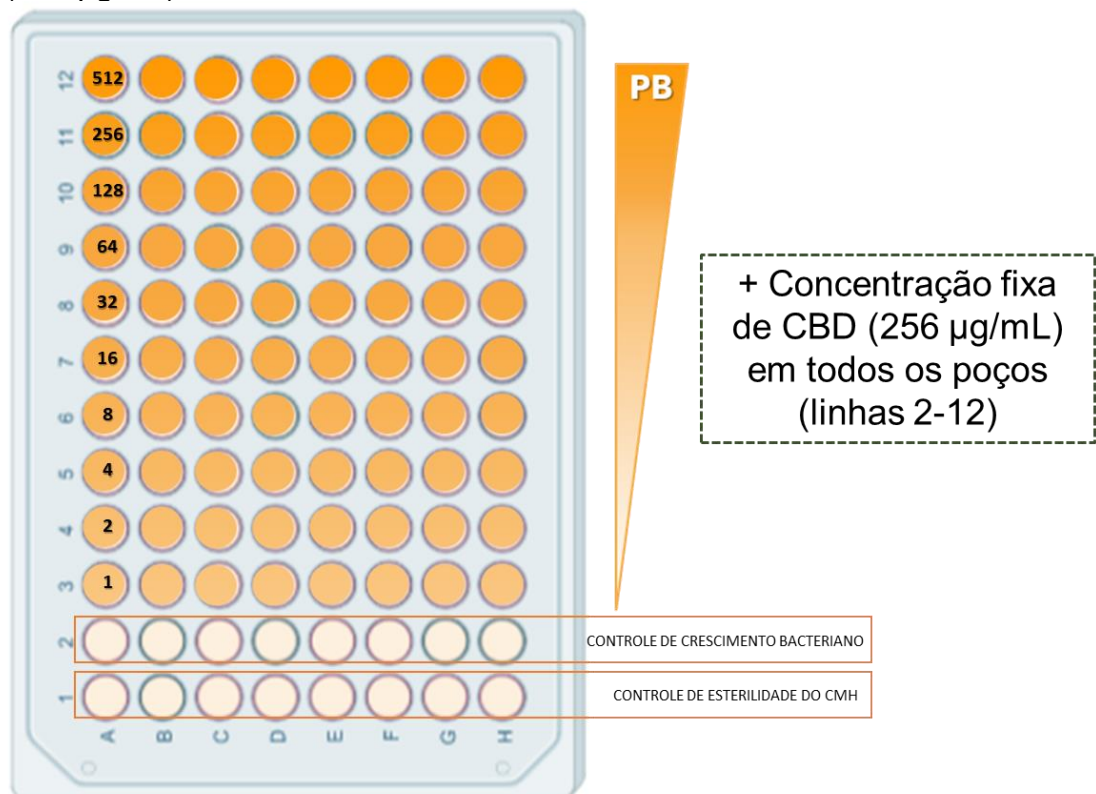
3.5. Investigação da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB contra bactérias gram-negativas

3.5.1. Triagem por microdiluição em caldo com concentração fixa de CDB (256 µg/mL)

Inicialmente, a atividade antibacteriana da combinação CBD + PB foi investigada a partir de uma triagem, contra bactérias gram-negativas (13 espécies, 52 linhagens) sensíveis e resistentes à PB (resistência cromossômica e plasmídeo), incluindo cepas padrão e isolados clínicos (Tabela 2).

Foi utilizado o método de referência, microdiluição em caldo, com adaptações, na qual foi realizada diluição seriada de PB (512 $\mu\text{g/mL}$ a 0,01 $\mu\text{g/mL}$) e adição de 256 $\mu\text{g/mL}$ de CBD (concentração fixa) em todos os poços, incluindo a linha controle de crescimento bacteriano (Figura 3).

Figura 3. Representação da triagem, por microdiluição em caldo, da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB com concentração fixa de CBD (256 $\mu\text{g/mL}$)



Created in BioRender.com bio

Fonte: Autoria própria. Elaborado em BioRender.com.

Os números em negrito representam as concentrações de PB em cada poço, após diluição seriada 1:2.

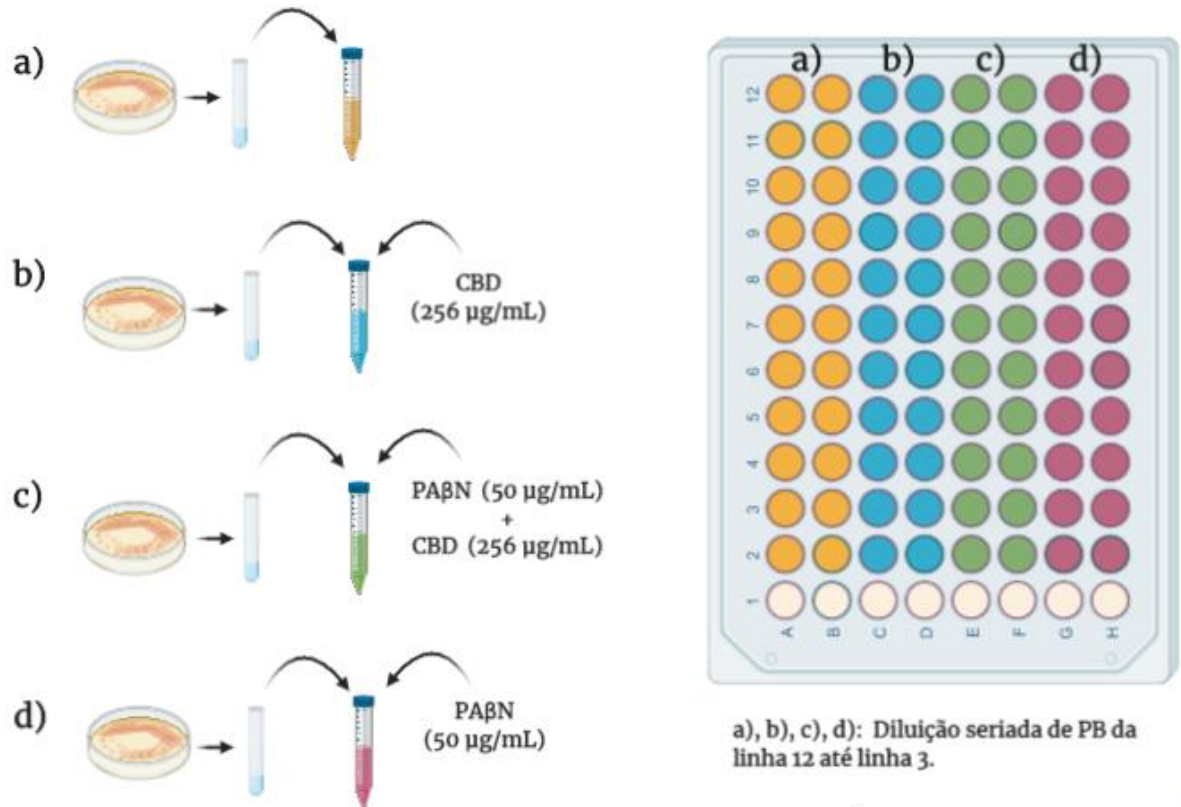
A etapa colorimétrica utilizando a solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) também foi realizada para melhor visualização da atividade antibacteriana da CBD.

3.5.2. Triagem por microdiluição em caldo na presença de PA β N

Para 7 espécies de BGN (13 linhagens), também foi realizada a triagem da avaliação da combinação CBD + PB, com concentração fixa de 256 $\mu\text{g/mL}$ de CBD, na presença de 50 $\mu\text{g/mL}$ do inibidor de bombas de efluxo PA β N, conforme ilustrado na Figura 4. Além da combinação CBD + PB + PA β N, também foi avaliada a

combinação PB + PA β N, para comparação. A combinação CBD + PA β N foi anteriormente realizada, como descrito no item 3.4.

Figura 4. Representação da triagem, por microdiluição em caldo, da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB na presença de PA β N



Created in BioRender.com

Fonte: Autoria própria. Elaborado em BioRender.com.

3.5.3. Confirmação por *checkerboard*

A confirmação da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB foi realizada pela técnica de *checkerboard* para 22 bactérias gram-negativas selecionadas: *K. pneumoniae* (n=12), *E. coli* (n=3), *A. baumannii* (n=2), *P. aeruginosa* (n=2), *M. catarrhalis* (n=1), *N. meningitidis* (n=1) e *N. gonorrhoeae* (n=1) (Tabelas 4 e 5).

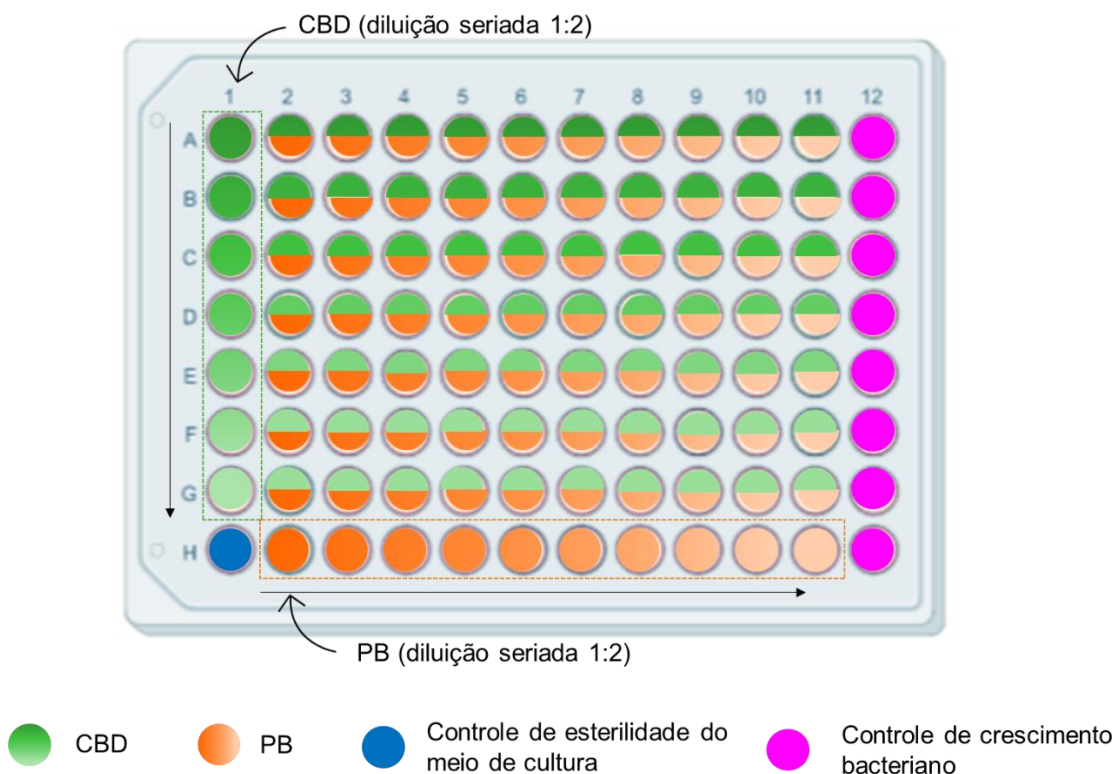
A técnica de *checkerboard* permite caracterizar os efeitos biológicos combinando duas substâncias (avaliando diferentes proporções de cada substância na combinação), entretanto, também é uma técnica mais laboriosa e dispendiosa, por isso foi inicialmente realizada a triagem utilizando o método de microdiluição em caldo, com as modificações citadas anteriormente no item 3.5.1 (ARAOKA et al., 2017;

BOSSO, 1996; BRENNAN-KROHN; KIRBY, 2019a; DOERN, 2014; LI et al., 2017; ODDS, 2003; TÄNGDÉN et al., 2017).

Em uma placa de 96 poços, combinações entre CBD e PB foram distribuídas a partir da diluição seriada de cada substância, em direções opostas. CBD foi diluído seriadamente da linha A até G, enquanto a diluição seriada de PB foi realizada em uma placa separada, na direção contrária, entre as linhas 2 e 11. A PB diluída seriadamente foi, então, transferida poço a poço para a placa teste, de forma a resultar nas diferentes proporções de concentrações entre as combinações de CBD e PB.

A coluna 1 foi utilizada para a determinação da CIM do CBD, tal como descrito previamente, com a diluição seriada do fármaco entre as linhas A a G. O poço H-1 foi reservado para o controle de esterilidade do meio de cultura. Entre os poços 2 e 11 da linha H foi realizada a determinação da CIM de PB. A coluna 12, por sua vez, foi reservada para o controle de crescimento bacteriano (Figura 5).

Figura 5. Representação da confirmação, por *checkerboard*, da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB



Fonte: Autoria própria. Elaborado em BioRender.com.

As concentrações de CBD variaram entre 4 e 256 µg/mL e de PB entre 0,01 e 512 µg/mL, a depender da linhagem bacteriana avaliada.

Em seguida, a suspensão bacteriana em CMH ou MH-F foi distribuída em toda a placa, exceto no poço H-1. Os resultados foram avaliados visualmente observando a presença de crescimento bacteriano e, também, após a adição de resazurina (Sigma-Aldrich Co. LLC.) em cada poço da microplaca, com o objetivo de melhor visualização da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB.

A técnica de *checkerboard* permite a determinação do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) para a combinação, que possibilita caracterizar a combinação como sinérgica, aditiva, indiferente ou antagônica (BRENNAN-KROHN; KIRBY, 2019a; DOERN, 2014). O cálculo matemático do ICIF está descrito a seguir:

$$CIF_{CBD} = [CBD] / CIM_{CBD}$$

$$CIF_{PB} = [PB] / CIM_{PB}$$

$$ICIF = CIF_{CBD} + CIF_{PB}$$

Sendo que:

- [CBD]: é a concentração do CBD avaliado em combinação;
- CIM_{CBD} : é a CIM do CBD avaliado isoladamente;
- [PB]: é a concentração do PB avaliada em combinação;
- CIM_{PB} : é a CIM de PB avaliada isoladamente.

Para a caracterização de ação sinérgica, a valor de ICIF deve ser menor ou igual a 0,5. Se o valor de ICIF for entre 0,5 e 1, a combinação tem ação aditiva; se estiver entre 1 e 4, efeito indiferente; e, se for maior que 4, as substâncias em conjunto resultam em efeito antagônico (DOERN, 2014). Assim, para que seja determinado o valor de ICIF, é necessário que as duas substâncias a serem investigadas em combinação possuam valores individuais de CIM frente à bactéria estudada, pois, do contrário, não é possível realizar o cálculo matemático do ICIF e por consequência não é possível atribuir matematicamente valores que caracterizam as ações ou os efeitos citados anteriormente.

Por vezes, algumas substâncias podem não apresentar valores de CIM detectados no intervalo de concentração investigado, ou mesmo podem não possuir atividade antimicrobiana (assim, não apresentarão CIM). Entretanto, a partir dos

resultados da triagem da atividade da combinação (item 3.5.1) é possível verificar se existe algum efeito combinatório de duas substâncias que resulte em atividade antibacteriana e, em seguida, realizar a técnica de *checkerboard* para determinar quais diferentes concentrações combinatórias poderiam promover efeitos biológicos na bactéria contribuindo para a inibição do crescimento bacteriano.

3.5.4. Avaliação por *time-kill*

A atividade antibacteriana da combinação CBD + PB também foi avaliada pelo ensaio de *time-kill* para medir a atividade bactericida da combinação CBD+PB, ao longo do tempo, contra quatro isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à PB: C9, L8, L28 e L29.

Foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias [UFC] por mL), adicionada ao CMH e incubada a 37°C sob agitação até que fosse atingida a escala 1,0 de McFarland ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL). Esta suspensão foi, então, adicionada a diferentes tubos de CMH contendo (i) CBD (4 µg/mL) + CAEM de PB; (ii) CBD (2 µg/mL) + CAEM de PB; (iii) CIM de PB; (iv) CAEM de PB; (v) CMH sem CBD ou PB, para controle do crescimento bacteriano (BRENNAN-KROHN; KIRBY, 2019b).

Após a adição da suspensão bacteriana a cada um dos tubos (tempo zero), uma alíquota de cada tubo foi retirada e diluída seriadamente (1:10) em placa de 96 poços. Uma alíquota de cada poço da placa foi adicionada a uma placa de AMH para posterior contagem do número de UFC. Os tubos foram incubados a 37°C sob agitação e o processo de retirada de alíquotas, diluição seriada e adição de alíquotas à placa de AMH foi repetido após 1h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24h.

A atividade antibacteriana da combinação CBD + PB foi considerada sinérgica quando a contagem de colônias correspondente ao tubo que contém a combinação foi menor ou igual a $2 \log_{10}$ em comparação ao componente mais ativo da combinação (PB). No caso de contagem de colônias menor ou igual a $3 \log_{10}$, em comparação ao inóculo inicial, a combinação apresentou efeito bactericida (BRENNAN-KROHN; PIRONTI;; KIRBY, 2018).

Resultados

4. Resultados

4.1. Atividade antibacteriana do CBD

Foi observada atividade antibacteriana do CBD (CIM) contra todas as 13 diferentes espécies (21 linhagens) de bactérias gram-positivas avaliadas, incluindo bactérias sensíveis e MDR: CIM = 2 µg/mL para *E. faecium* (n=2); CIM = 4 µg/mL para *Enterococcus* spp. (n=4), *Staphylococcus* spp. (n=10), *Micrococcus luteus* (n=1), e *Rhodococcus equi* (n=1); CIM = 32 µg/mL para *Streptococcus pyogenes* (n=1) e *Streptococcus pneumoniae* (n=1); e CIM = 64 µg/mL para *Streptococcus agalactiae* (n=1) (Tabela 1).

Tabela 1. CIM de CBD contra as linhagens bacterianas estudadas

CIM de CBD (µg/mL)	Linhagens	Características e Referências
COCOS GRAM-POSITIVOS		
2	<i>Enterococcus faecium</i> NCTC 7171 ^T	Cepa tipo
	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 51559	VRE, <i>vanA</i>
4	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Linhagem controle de qualidade
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	VRE, <i>vanB</i>
	<i>Enterococcus casseliflavus</i> ATCC 12361	Linhagem sensível
	<i>Enterococcus gallinarum</i> ATCC 12359	Linhagem sensível
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Linhagem controle de qualidade
	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC 43300	MRSA, <i>mecA</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i> N315	MRSA/VSSA
	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC 700698 [Mu3]	MRSA, <i>mecA</i> ; hVISA
	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC 700699 [Mu50]	MRSA, <i>mecA</i> ; VISA
	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC BAA-976	Resistência a macrolídeo mediada por <i>msr(A)</i>
	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> ATCC BAA-977	Resistência induzível mediada por <i>erm(A)</i>
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> ATCC 43809 ^T	Cepa tipo
	<i>Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus</i> ATCC 53050 ^T	Cepa tipo
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 ^T	Cepa tipo
	<i>Micrococcus luteus</i> CCT 2688	Linhagem sensível
<i>Rhodococcus equi</i> ATCC 6939	Linhagem controle de qualidade	

Continua

Continuação

CIM de CBD (µg/mL)	Linhasgens	Características e Referências
32	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 12344 ^T	Cepa tipo
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Linagem controle de qualidade
64	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813 ^T	Cepa tipo
MICOBACTÉRIAS		
12,5	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294 ^T	Cepa tipo
25	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CF86	Isolado clínico MDR (MIYATA et al., 2011)
DIPLOCOCOS GRAM-NEGATIVOS (DGN)		
64	<i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC 25238 ^T	Cepa tipo
128	<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13077 ^T	Cepa tipo
256	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 19424 ^T	Cepa tipo
BACILOS GRAM-NEGATIVOS (BGN)		
> 256	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 33391 ^T	Cepa tipo
	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> ATCC 13883 ^T	Cepa tipo
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1705	ST 258; CRE/CPE, KPC-2; Sensível à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA-1706	Controle negativo de produção de KPC
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13443	CRE/CPE, NDM, Sensível à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> C9	ST 11; ESBL, CTX-M-2; Resistente à PB [mutação no gene <i>mgrB</i>]; (PALMEIRO et al., 2019)

Continua

Continuação

CIM de CBD (µg/mL)	Linhagens	Características e Referências
> 256	<i>Klebsiella pneumoniae</i> D1	ST 11; ESBL, CTX-M-2; (PALMEIRO et al., 2019)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RP62	ST 11; CRE/CPE, KPC-2; (ANDRADE et al., 2014)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L1	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L2	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L3	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L5	Isolado clínico; Sensível à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L8	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L9	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L12	Isolado clínico; Sensível à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L13	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L14	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L15	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L16	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L17	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L18	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L19	Isolado clínico; Resistente à PB
<i>Klebsiella pneumoniae</i> L22	Isolado clínico; Resistente à PB	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> L26	Isolado clínico; Resistente à PB	

Continua

Continuação

CIM de CBD (µg/mL)	Linhagens	Características e Referências
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L27	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L28	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L29	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L30	Isolado clínico; Sensível à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L31	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L33	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> L34	Isolado clínico; Resistente à PB
	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> ATCC 700603	ESBL, SHV-18
> 256	<i>Klebsiella oxytoca</i> CCT 0182	Linhagem sensível
	<i>Klebsiella aerogenes</i> ATCC 13048 [†]	Cepa tipo
	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047 [†]	Cepa tipo
	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 23355	Linhagem sensível
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Linhagem controle de qualidade, Sensível à PB
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Linhagem controle de qualidade
	<i>Escherichia coli</i> CTX-M-15	ST 131; ESBL, CTX-M-15; Sensível à PB
	<i>Escherichia coli</i> RP62T	Transconjugante azida-resistente produtora de KPC, Sensível à PB; (ANDRADE et al., 2014)

Continua

Continuação

CIM de CBD (µg/mL)	Linhagens	Características e Referências
> 256	<i>Escherichia coli</i> 72H	Resistente à PB, <i>Plasmid-mediated colistin-resistant</i> (MCR-1); (FERNANDES et al., 2016)
	<i>Escherichia coli</i> NCTC 13846	Resistente à PB, <i>Plasmid-mediated colistin-resistant</i> (MCR-1), Linhagem controle de qualidade
	<i>Pantoea agglomerans</i> ATCC 33243 ^T	Cepa tipo
	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544 ^T	Cepa tipo
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 ^T	Cepa tipo
	<i>Serratia marcescens subsp. marcescens</i> ATCC 13880 ^T	Cepa tipo, intrinsecamente resistente à PB
	<i>Providencia rettgeri</i> ATCC 29944 ^T	Cepa tipo, intrinsecamente resistente à PB
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906 ^T	Cepa tipo, intrinsecamente resistente à PB
	<i>Salmonella enterica subsp. enteric</i> (serovar Enteritidis) ATCC 13076	Linhagem controle de qualidade
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022 ^T	Cepa tipo
	<i>Plesiomonas shigelloides</i> ATCC 14029 ^T	Cepa tipo
	<i>Hafnia alvei</i> ATCC 11604	Linhagem sensível
	<i>Edwardsiella tarda</i> ATCC 15947 ^T	Cepa tipo, intrinsecamente resistente à PB
	<i>Morganella morganii</i> ATCC 8019	Intrinsecamente resistente à PB
	<i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i> ATCC 9610 ^T	Cepa tipo

Continua

Continuação

CIM de CBD (µg/mL)	Linhasgens	Características e Referências
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 ^T	Cepa tipo, Sensível à PB
	<i>Acinetobacter baumannii</i> 136 SP	ST 109; CRAB, OXA-23 e OXA-143; Sensível à PB (CLÍMACO et al., 2013)
	<i>Acinetobacter baumannii</i> L7	Isolado clínico; Sensível à PB
	<i>Acinetobacter baumannii</i> L21	Isolado clínico; Sensível à PB
	<i>Acinetobacter baumannii</i> L25	Isolado clínico; Sensível à PB
	<i>Acinetobacter baumannii</i> L35	Isolado clínico; Sensível à PB
> 256	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Linhagem controle de qualidade, Sensível à PB
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> HC103	ST 277; SPM-1, Sensível à PB (GALETTI et al., 2015)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> L36	Isolado clínico; Sensível à PB
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Sensível à PB
	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 15175	Linhagem sensível
	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966 ^T	Cepa tipo
	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> ATCC 8750 ^T	Cepa tipo
	<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416 ^T	Cepa tipo, intrinsecamente resistente à PB
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13637 ^T	Cepa tipo, Sensível à PB

NCTC: National Collection of Type Cultures; ATCC: American Type Culture Collection; ^T: cepa tipo; CCT: Coleção de Culturas Tropical, Fundação Andre Tosello, Campinas – SP, Brasil; ST: sequence type.

Rhodococcus equi, *Haemophilus influenzae* e *Acinetobacter baumannii* são cocobacilos.

A atividade antibacteriana do CBD também foi observada contra DGN que expressam LOS: *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238 (CIM = 64 µg/mL), *Neisseria meningitidis* ATCC 13077 (CIM = 128 µg/mL) e *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 19424 (CIM = 256 µg/mL).

Adicionalmente, CBD foi antibacteriano contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (CIM = 9,37±1,88 µg/mL) e *M. tuberculosis* CF86 MDR (CIM = 18,78±5,95 µg/mL).

Não foi observada diferença entre os valores de CIM e CBM entre as bactérias avaliadas, tanto sensíveis como resistentes, sugerindo a atividade do CBD como sendo bactericida.

Para *S. aureus* ATCC 29213, foi observada maior CIM de CBD (64 µg/mL) quando o experimento foi realizado utilizando caldo MH-F (5% sangue de cavalo lisado + 0,1% β-NAD 20 mg/mL), em comparação ao protocolo padrão usando o caldo Mueller Hinton II Cátion-Ajustado (CMH) para *S. aureus* (CIM = 4 µg/mL) (Figura 6).

Figura 6. Resultados de CIM de CBD contra *S. aureus* ATCC 29213 quando utilizado meio de cultura CMH e MH-F



Fonte: Autoria própria.

As quatro primeiras colunas (à esquerda) representam o ensaio com CMH, enquanto as últimas quatro colunas (à direita) representam o ensaio com caldo MH-F. Os números em cada poço representam as concentrações de CBD ou vancomicina (VAN) em cada poço, após diluição seriada 1:2. O antibiótico VAN foi utilizado como controle para comparação.

Em relação aos BGN, o CBD não foi antibacteriano em concentrações de até 256 µg/mL contra todos os BGN avaliados (Tabela 1). Para *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *A. baumannii* ATCC 19606 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, concentrações mais altas de CBD também foram avaliadas e, novamente, nenhuma atividade antibacteriana foi observada até 8.192 µg/mL.

Adicionalmente, não foi observada nenhuma atividade antibacteriana do CBD na presença de inibidores de bomba de efluxo (PAβN, reserpina ou curcumina) contra os patógenos ESKAPE (*K. pneumoniae* ATCC 13883, *A. baumannii* ATCC 19606, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. cloacae* ATCC 13047), *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 72H (isolado clínico com resistência à polimixina mediada por plasmídeo [MCR-1]) e *S. maltophilia* ATCC 13637. Para todas as bactérias avaliadas, CBD combinado aos inibidores de efluxo não foi antibacteriano até a concentração de 256 µg/mL.

4.2. Atividade antibacteriana da combinação CBD + PB

4.2.1. Triagem por microdiluição em caldo com concentração fixa de CDB (256 µg/mL)

Foi observada atividade antibacteriana da combinação CBD + PB contra a maioria dos BGN avaliados (8/13 espécies; 47/52 linhagens), incluindo cepas padrão e isolados clínicos (Tabela 2 e Figura 7).

Figura 7. Atividade antibacteriana da combinação CBD + PB, CBD + PB + PA β N e CBD + PA β N contra *E. coli* ATCC 25922



Fonte: Autoria própria.

Os valores em cada poço representam a concentração de PB.

Tabela 2. Concentrações antibióticas de efeito mínimo (CAEM) de PB necessárias para a atividade antibacteriana da combinação CBD (256 µg/mL) + PB, em comparação à CIM de PB, para cada linhagem avaliada na triagem da atividade antibacteriana da combinação CBD + PB.

Linhagem	PB (µg/mL)	
	CAEM na combinação CBD + PB	CIM
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 ^T	0.125	8
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1705	0.25	0.5
<i>K. pneumoniae</i> NCTC 13443	0.06	1
<i>K. pneumoniae</i> C9	≤ 1	64
<i>K. pneumoniae</i> D1	0.25	1
<i>K. pneumoniae</i> RP 62	≤ 0.5	32
<i>K. quasipneumoniae</i> ATCC 700603	0.125	0.5
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047 ^T	≤ 0.5	256
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.06	0.5
<i>E. coli</i> CTX-M-15	0.06	0.5
<i>E. coli</i> RP62T	≤ 0.01	2
<i>E. coli</i> 72H	1	2
<i>E. coli</i> NCTC 13846	1	2
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 ^T	0.25	1
<i>A. baumannii</i> 136 SP	0.25	1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1	1
<i>P. aeruginosa</i> HC 103	1	2
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0.5	1
<i>S. maltophilia</i> ATCC 13673 ^T	0.25	2
<i>E. tarda</i> ATCC 15947 ^T	0.25	> 8
<i>S. marcescens</i> ATCC 13880	> 8	> 8
<i>P. rettgeri</i> ATCC 29944	> 8	> 8
<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906	> 8	> 8
<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	> 8	> 8
<i>M. morgani</i> ATCC 8019	> 8	> 8
<i>K. pneumoniae</i> L1	≤ 0.25	8
<i>K. pneumoniae</i> L2	≤ 0.5	64
<i>K. pneumoniae</i> L3	≤ 0.25	64
<i>K. pneumoniae</i> L5	≤ 0.03	1

Continua

Continuação

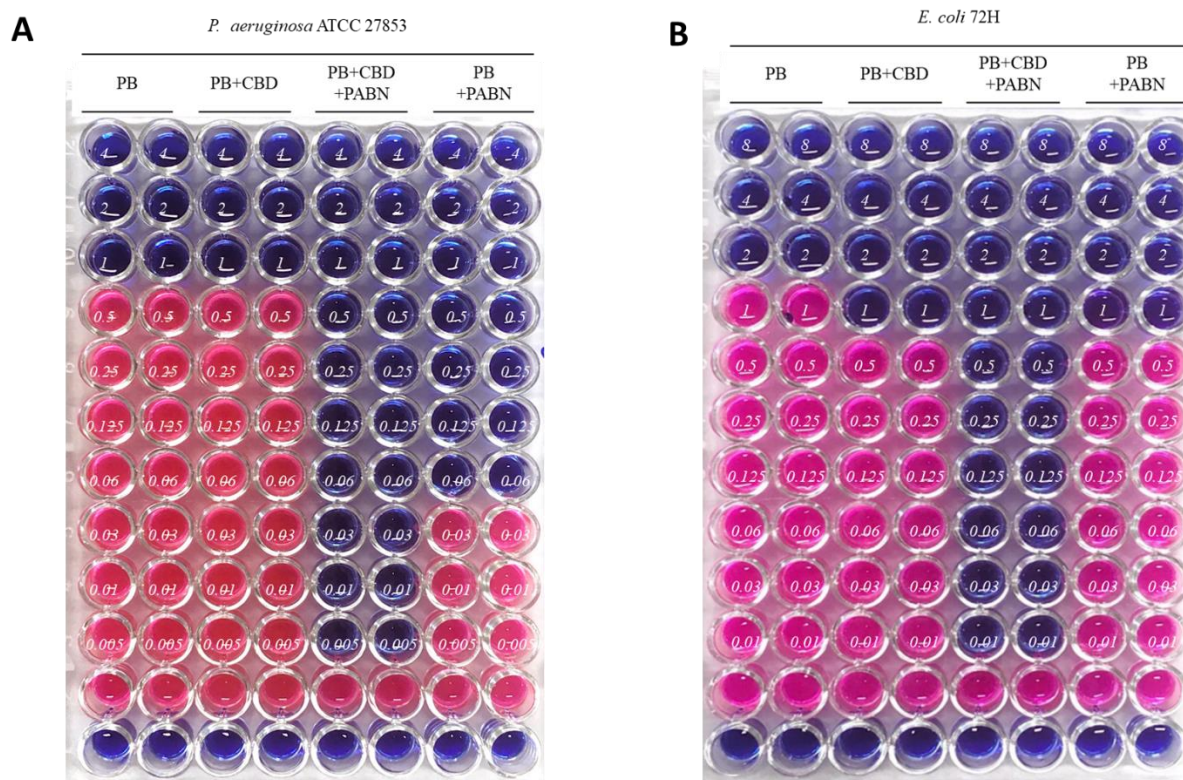
Linhagem	PB ($\mu\text{g/mL}$)	
	CAEM na combinação CBD + PB	CIM
<i>K. pneumoniae</i> L8	≤ 0.25	128
<i>K. pneumoniae</i> L9	≤ 0.25	32
<i>K. pneumoniae</i> L12	0.06	2
<i>K. pneumoniae</i> L13	≤ 0.25	16
<i>K. pneumoniae</i> L14	≤ 0.25	32
<i>K. pneumoniae</i> L15	0.5	4
<i>K. pneumoniae</i> L16	0.5	4
<i>K. pneumoniae</i> L17	≤ 0.5	32
<i>K. pneumoniae</i> L18	0.5	4
<i>K. pneumoniae</i> L19	1	16
<i>K. pneumoniae</i> L22	≤ 0.5	256
<i>K. pneumoniae</i> L26	≤ 0.5	64
<i>K. pneumoniae</i> L27	0.06	2
<i>K. pneumoniae</i> L28	≤ 0.5	32
<i>K. pneumoniae</i> L29	≤ 0.25	16
<i>K. pneumoniae</i> L30	0.25	1
<i>K. pneumoniae</i> L31	0.06	8
<i>K. pneumoniae</i> L33	0.06	16
<i>K. pneumoniae</i> L34	≤ 0.125	32
<i>A. baumannii</i> L7	≤ 0.03	2
<i>A. baumannii</i> L21	0.125	1
<i>A. baumannii</i> L25	0.125	1
<i>A. baumannii</i> L35	0.125	0.5
<i>P. aeruginosa</i> L36	1	2

Conclusão

Na combinação CBD (256 $\mu\text{g/mL}$) + PB (0,01 - 512 $\mu\text{g/mL}$), em comparação com a CIM de PB, foi observada uma redução de no mínimo três diluições seriadas 1:2 na concentração de PB (CAEM de PB) necessária para a inibição bacteriana de BGN sensíveis à PB. Contra linhagens de *K. pneumoniae* sensíveis à PB, a combinação CBD + PB levou a uma redução de 2 diluições seriadas 1:2 na concentração de PB em comparação com a CIM de PB.

Paralelamente, foi observada nenhuma ou redução de apenas uma vez para *P. aeruginosa* (Tabela 2 e Figura 8).

Figura 8. Atividade antibacteriana da combinação CBD + PB + PA β N contra *P. aeruginosa* sensível à PB e isolado clínico de *E. coli* com resistência à PB mediada por plasmídeo (MCR-1)



Fonte: Autoria própria.

Os valores em cada poço representam a concentração de PB. **(A)** Resultados para *P. aeruginosa* ATCC 27853, sensível à PB. **(B)** Resultados para *E. coli* 72H, isolado clínico com resistência à PB mediada por plasmídeo (MCR-1)

Em relação aos BGN resistentes à PB (*Enterobacteriales*), a combinação de CBD com baixas concentrações de PB ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$) apresentou atividade antibacteriana contra BGN com resistência cromossômica à PB, incluindo *K. pneumoniae* resistentes à PB (Tabela 2). Entretanto, para as linhagens de *E. coli* com resistência à PB mediada por plasmídeo (MCR-1), foi observada redução de apenas uma vez na concentração de PB em comparação com a CIM de PB (Tabela 2 e Figura 8).

A combinação CBD + PB + PA β N também resultou em atividade antibacteriana contra a BGN, de modo que foram necessárias concentrações menores de PB quando comparadas às concentrações de PB na combinação CBD + PB (Tabela 3 e Figura 7). Curiosamente, esta combinação (CBD + PB +

PA β N) também mostrou atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* e linhagens de *E. coli* com resistência à PB mediada por plasmídeo (MCR-1) (Tabela 3 e Figura 8).

Tabela 3. Concentrações antibióticas de efeito mínimo (CAEM) de PB na combinação CBD (256 µg/mL) + PB + PAβN (50 µg/mL).

Linhagem	CIM de PB (µg/mL)	CBD 256 µg/mL	CBD 256 µg/mL + PAβN 50 µg/mL	PAβN 50 µg/mL
		+ CAEM de PB (µg/mL)	+ CAEM de PB (µg/mL)	+ CAEM de PB (µg/mL)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 ^T	8	0.125	≤ 0.01	8
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1705	0.5	0.25	0.01	0.25
<i>K. quasipneumoniae</i> ATCC 700603	0.5	0.125	0.03	0.25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.5	0.06	≤ 0.002	0.03
<i>E. coli</i> 72H	2	1	≤ 0.01	1
<i>E. coli</i> NCTC 13846	2	1	≤ 0.03	1
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 ^T	1	0.25	≤ 0.005	1
<i>A. baumannii</i> 136 SP	1	0.25	0.06	1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1	1	≤ 0.005	0.06
<i>P. aeruginosa</i> HC 103	2	1	≤ 0.005	0.06
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	1	0.5	≤ 0.005	0.06
<i>S. maltophilia</i> 13673 ^T	2	0.25	≤ 0.01	0.03
<i>E. tarda</i> ATCC 15947 ^T	>8	0.25	≤ 0.01	>8

CBD + PB também apresentou atividade antibacteriana contra *E. tarda* ATCC 15947, intrinsecamente resistente à PB (Tabela 2). Entretanto, para outras bactérias com resistência intrínseca à PB (*B. cepacia* ATCC 25416, *M. morgani* ATCC 8019, *P. rettgeri* ATCC 29944, *P. mirabilis* ATCC 29906 e *S. marcescens* subsp. *marcescens* ATCC 13880), nenhuma atividade antibacteriana de CBD + PB foi observada. Para essas bactérias, a combinação de CBD + PB não teve atividade antibacteriana nem mesmo na presença de PAβN. A exceção foi *E. tarda* ATCC 15947, para a qual a combinação CBD + PB + PAβN também teve atividade antibacteriana, mostrando mais uma vez a atividade antibacteriana do CBD na presença de concentrações mais baixas de PB (Tabela 3).

4.2.2. Confirmação por *checkerboard*

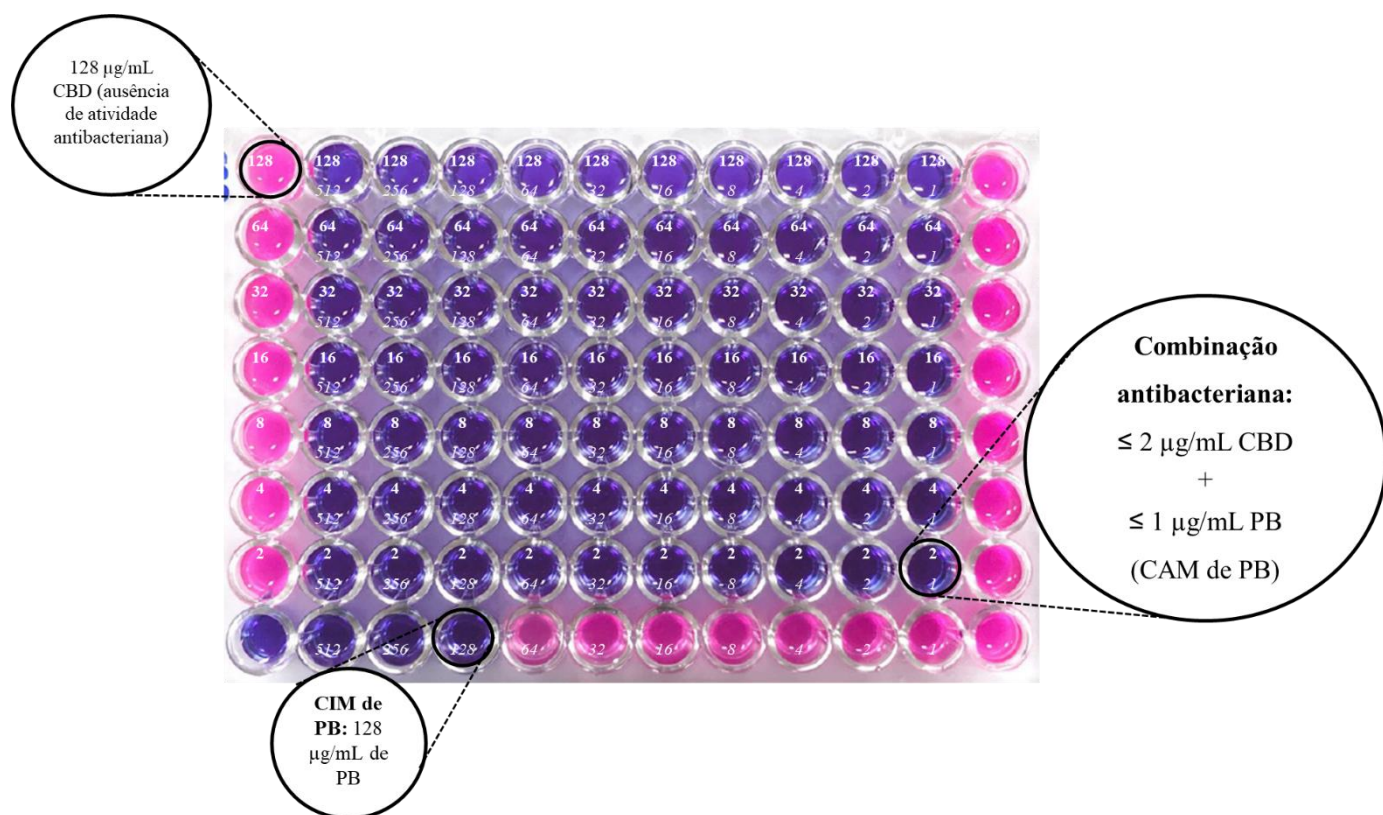
Os resultados de *checkerboard* mostraram que, para a maioria dos BGN (incluindo *K. pneumoniae* resistentes à PB), 2-4 µg/mL de CBD foram suficientes para inibir o crescimento bacteriano quando combinados com baixas concentrações de PB (≤ 2 µg/mL) (Tabela 4 e Figura 9). Especialmente para a maioria dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à PB, a combinação de ≤ 2 µg/mL de CBD com $\leq 0,5$ µg/mL de PB foi antibacteriana.

Tabela 4. Mínimas concentrações de CBD e PB (CAEM de PB) para a atividade antibacteriana da combinação CBD + PB, a partir dos resultados de *checkerboard*

Linagem	Combinação CBD + PB (µg/mL)		CIM de PB (µg/mL)
	CBD	CAEM de PB	
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 ^T	4	0.03	8
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA-1705	4	0.25	0.5
<i>K. pneumoniae</i> C9	4	2	64
<i>K. pneumoniae</i> D1	4	0.25	1
<i>K. pneumoniae</i> RP 62	2	1	32
<i>K. pneumoniae</i> L8	2	≤ 1	128
<i>K. pneumoniae</i> L13	2	≤ 0.25	32
<i>K. pneumoniae</i> L17	4	2	32
<i>K. pneumoniae</i> L22	2	≤ 0.5	256
<i>K. pneumoniae</i> L28	2	≤ 0.5	32
<i>K. pneumoniae</i> L29	2	≤ 0.5	32
<i>K. pneumoniae</i> L34	2	0.5	32
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	0.06	0.5
<i>E. coli</i> CTX-M-15	8	0.03	0.5
<i>E. coli</i> NCTC 13846	4 + PAβN*	0.03	2
<i>E. coli</i> 72H	4 + PAβN*	0.03	2
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606 ^T	4	0.125	1
<i>A. baumannii</i> 136 SP	1	0.25	1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4 + PAβN*	0.03	1
<i>P. aeruginosa</i> HC 103	4 + PAβN*	0.03	2

*Para *E. coli* NCTC 13846 e 72H (produtoras de MCR-1), *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *P. aeruginosa* HC 103, os experimentos foram realizados na presença de 50 µg/mL de PAβN.

Figura 9. Resultado representativo de *checkerboard* para confirmação da atividade antibacteriana da combinação CBD+PB contra *K. pneumoniae* L8

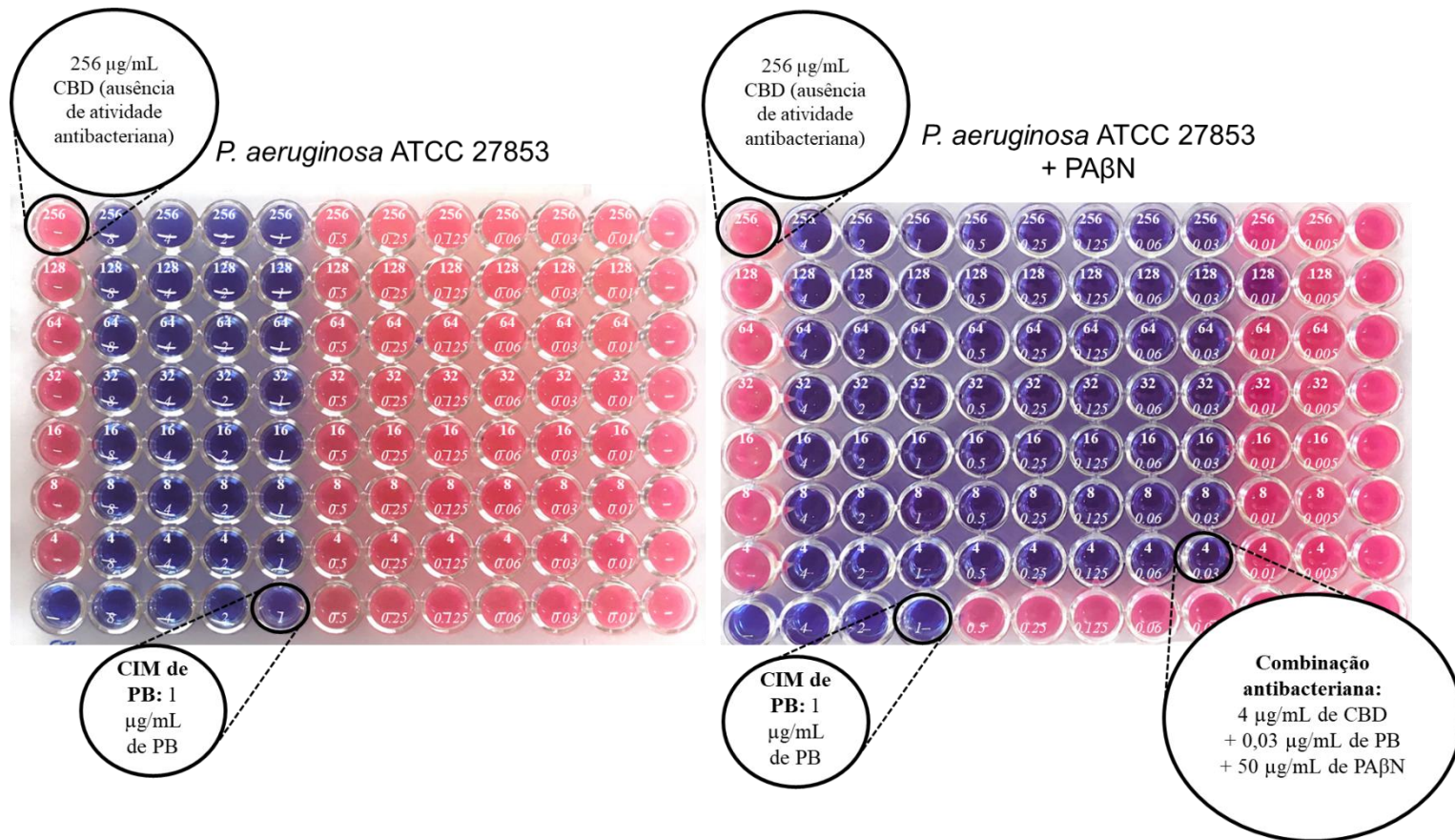


Fonte: Autoria própria.

Os valores em cada poço representam a concentração de cada fármaco, em $\mu\text{g/mL}$: CBD em negrito; PB em *itálico*. A coluna 12 representa os poços de controle de crescimento bacteriano. O poço H-1 foi reservado para controle de esterilidade do meio de cultura.

Para *P. aeruginosa* ATCC 27853 e HC103 (linhagens sensíveis à PB) e para as linhagens *E. coli* NCTC 13846 e 72H (produtoras de MCR-1), o *checkerboard* também foi realizado na presença de PA β N. Os resultados mostraram que a combinação CBD (4 $\mu\text{g/mL}$) + PB foi antibacteriana apenas na presença de PA β N (Tabela 4 e Figura 10).

Figura 10. Comparação dos resultados de *checkerboard* de CBD + PB contra *P. aeruginosa* ATCC 27853, na ausência e presença de PAβN (50 µg/mL)



Fonte: Autoria própria.

À esquerda, resultados na ausência de PAβN. À direita, resultados na presença de PAβN. Os valores em cada poço representam a concentração de cada fármaco, em µg/mL: CBD em negrito; PB em *itálico*. A coluna 12 representa os poços de controle de crescimento bacteriano. O poço H-1 foi reservado para controle de esterilidade do meio de cultura.

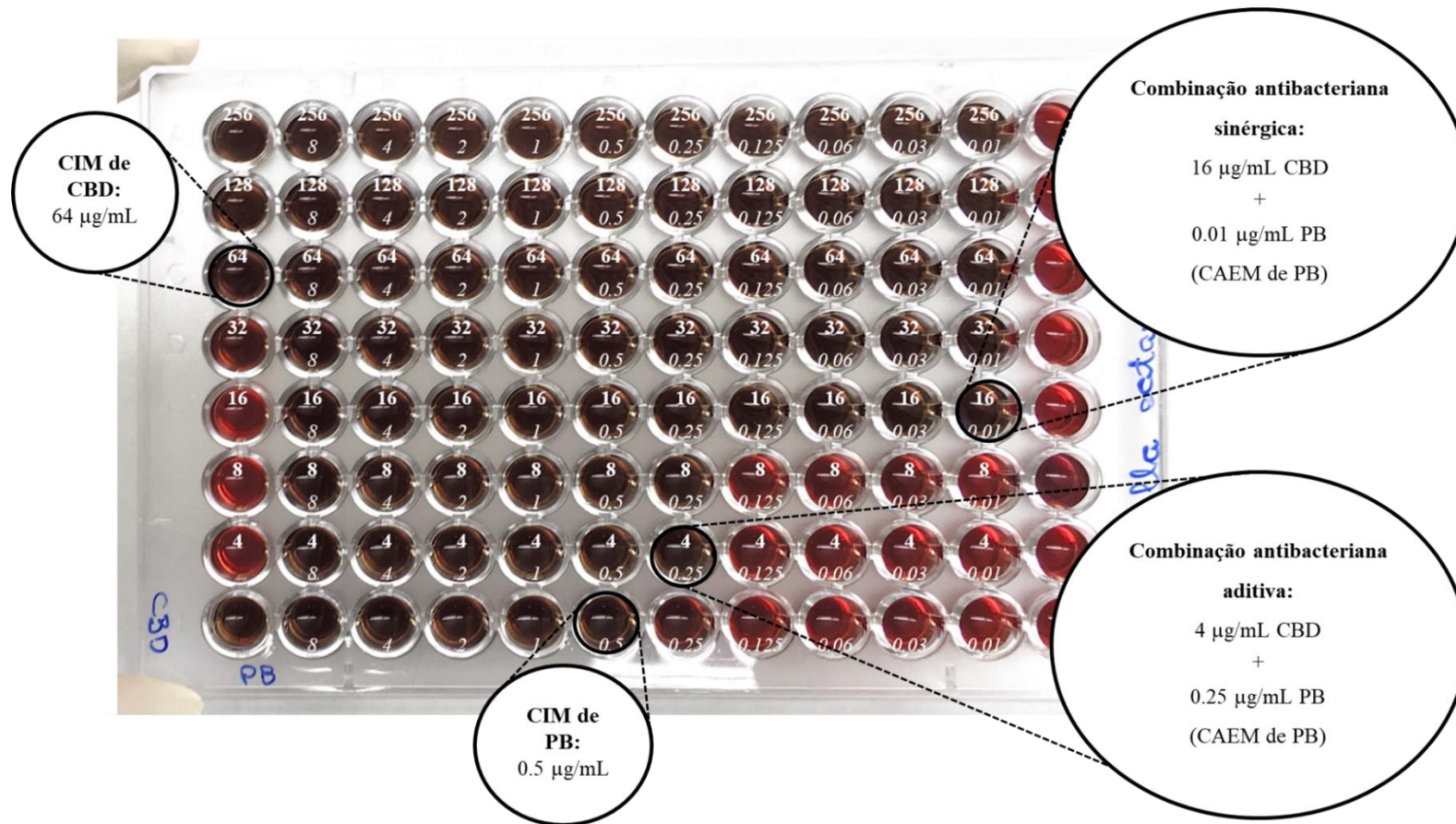
Para BGN, o ICIF da combinação CBD + PB não foi calculado devido à ausência de atividade antibacteriana (CIM) do CBD contra essas bactérias.

Para os DGN *M. catarrhalis* ATCC 25238, *N. meningitidis* ATCC 13077, e *N. gonorrhoeae* ATCC 19424, o ICIF da combinação CBD + PB foi calculado porque tanto CBD quanto a PB sozinhos apresentaram atividade antibacteriana (CIM). Dessa forma, a combinação CBD + PB mostrou efeito aditivo e/ou sinérgico contra esses DGN estudados (Tabela 5 e Figuras 11, 12 e 13).

Tabela 5. Mínimas concentrações de CBD e PB (CAEM de PB) para a atividade antibacteriana da combinação CBD + PB contra DGN, a partir dos resultados de *checkerboard*, além do ICIF calculado e efeito resultante da combinação.

Linhagem	CIM de CBD ($\mu\text{g/mL}$)	Combinação		CIM de PB ($\mu\text{g/mL}$)	ICIF	Efeito
		CBD + PB ($\mu\text{g/mL}$)				
		CBD	CAEM de PB			
<i>M. catarrhalis</i> ATCC 25238	64	4	0.25	0.5	0.56	Aditivo
		16	0.01		0.27	Sinérgico
<i>N. meningitidis</i> ATCC 13077	128	32	2	64	0.28	Sinérgico
		16	8		0.25	
		8	16		0.31	
<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC 19424	256	32	0.5	16	0.155	Sinérgico
		16	4		0.31	

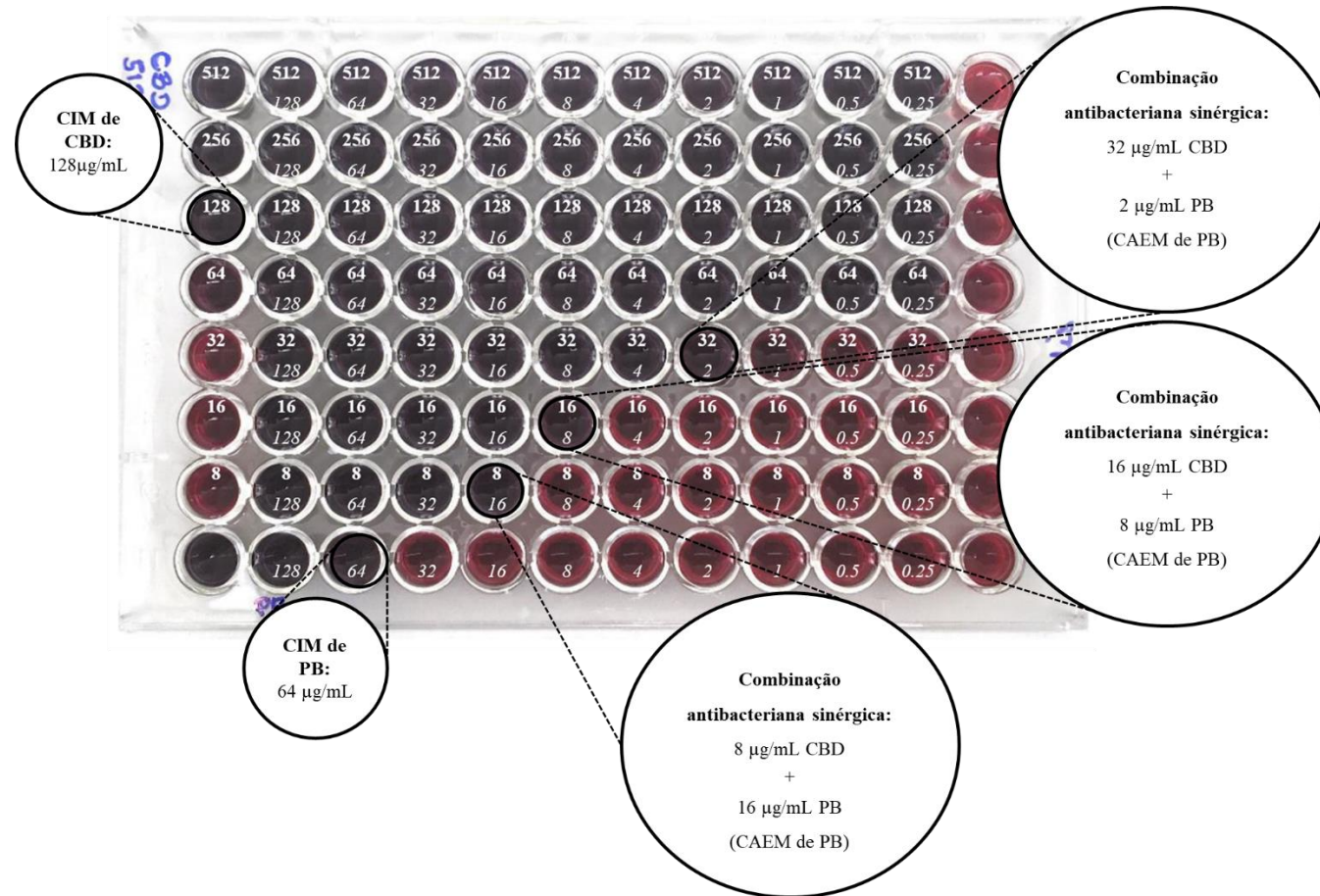
Figura 11. Resultados de *checkerboard* para confirmação da atividade antibacteriana da combinação CBD+PB contra *Moraxella catarrhalis*



Fonte: Autoria própria.

Os valores em cada poço representam a concentração de cada fármaco, em µg/mL: CBD em negrito; PB em itálico. A coluna 12 representa os poços de controle de crescimento bacteriano. O poço H-1 foi reservado para controle de esterilidade do meio de cultura.

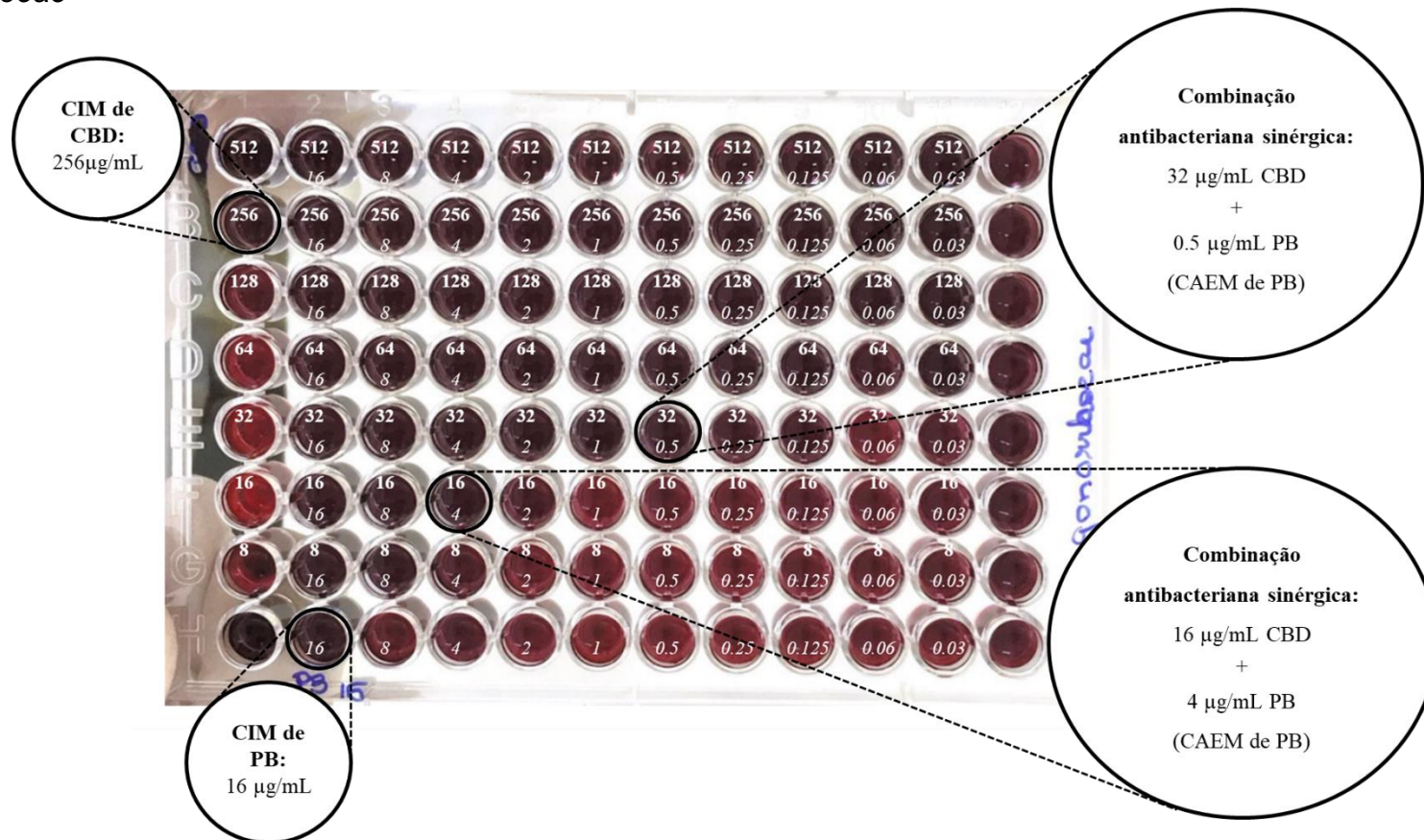
Figura 12. Resultados de *checkerboard* para confirmação da atividade antibacteriana da combinação CBD+PB contra *Neisseria meningitidis*



Fonte: Autoria própria.

Os valores em cada poço representam a concentração de cada fármaco, em µg/mL: CBD em negrito; PB em *italico*. A coluna 12 representa os poços de controle de crescimento bacteriano. O poço H-1 foi reservado para controle de esterilidade do meio de cultura.

Figura 13. Resultados de *checkerboard* para confirmação da atividade antibacteriana da combinação CBD+PB contra *Neisseria gonorrhoeae*



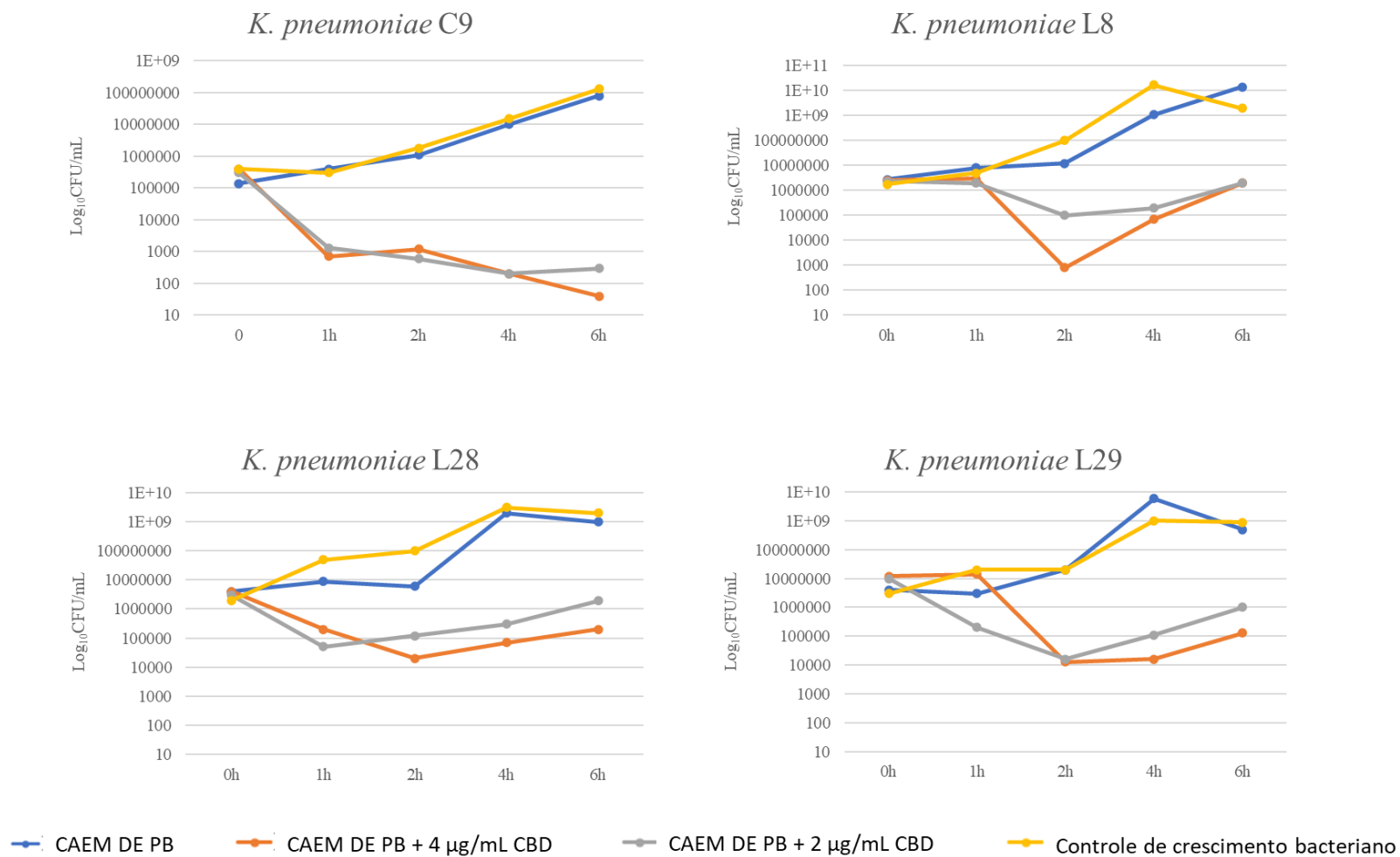
Fonte: Autoria própria.

Os valores em cada poço representam a concentração de cada fármaco, em µg/mL: CBD em negrito; PB em *italico*. A coluna 12 representa os poços de controle de crescimento bacteriano. O poço H-1 foi reservado para controle de esterilidade do meio de cultura.

4.2.3. Resultados dos ensaios de *time-kill*

Os resultados dos ensaios de *time-kill* realizados para quatro isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes à PB mostraram que a combinação CBD + PB leva a maior redução no número de UFC/mL em comparação com CBD e PB sozinhos, na mesma concentração utilizada em combinação (Figura 14). Foi observado efeito sinérgico da combinação CBD + PB contra os quatro isolados clínicos avaliados, entre duas e seis horas de incubação, tanto na combinação de 4 µg/mL CBD + CAEM de PB quanto na combinação de 2 µg/mL CBD + CAEM de PB (Tabela 6).

Figura 14. Gráficos representativos da dinâmica de inibição do crescimento/morte bacteriano, a partir dos experimentos de *time-kill*



Fonte: Autoria própria.

Tabela 6. Diferença entre \log_{10} UFC/mL após atividade da combinação CBD + PB e após atividade da CAEM de PB, a partir dos experimentos de *time-kill*

Linhagem	CBD = 4 μ g/mL				CBD = 2 μ g/mL			
	1h	2h	4h	6h	1h	2h	4h	6h
<i>K. pneumoniae</i> C9	-2,79588	-1,22185	-4,07918	-3	-0,39794	-0,97881	-1,60206	-1,47712
<i>K. pneumoniae</i> L8	-0,42597	-4,17609	-4,19629	-3,8451	-0,60206	-2,07918	-3,74036	-3,8451
<i>K. pneumoniae</i> L28	-1,65321	-2,47712	-4,45593	-3,69897	-2,25527	-1,69897	-3,82391	-2,72125
<i>K. pneumoniae</i> L29	0,669007	-3,18709	-5,57403	-3,58503	-1,17609	-3,09691	-4,73676	-2,69897

As células sombreadas em cinza representam momentos em que a combinação mostrou atividade sinérgica.

Discussão

5. Discussão

5.1. Atividade antibacteriana do CBD

Foi observada atividade antibacteriana de CBD ultrapuro contra bactérias gram-positivas, *M. tuberculosis* e DGN que expressam LOS, mas não contra BGN, como previamente descrito (ANDRADE et al., 2018; BLASKOVICH et al., 2021; FARHA et al., 2020; MARTINENGGHI et al., 2020).

Os resultados deste trabalho também fornecem dados sobre a atividade antibacteriana do CBD contra outras espécies bacterianas: *Enterococcus casseliflavus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Micrococcus luteus*, e *Rhodococcus equi* e também contra outras bactérias gram-positivas expressando diferentes fenótipos/genótipos (Tabela 1). Em geral, os dados deste estudo e relatos anteriores mostraram CIMs de CBD variando de 2 a 4 µg/mL contra bactérias gram-positivas, incluindo *E. faecium* resistente à vancomicina (VRE) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e resistente à vancomicina (VISA), os quais estão na lista de patógenos prioritários da OMS para P&D de novos antibióticos.

Os dados deste estudo diferem dos dados de Blaskovich et al. (2021) sobre CIMs de CBD contra *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *M. catarrhalis*, e *M. tuberculosis* (BLASKOVICH et al., 2021). As diferenças nos valores de CIM observados podem estar relacionadas aos diferentes materiais e métodos empregados em cada um dos estudos. Para bactérias fastidiosas, tais como *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *M. catarrhalis* e *N. meningitidis*, foi utilizado caldo MH-F (CMH suplementado com 5% de sangue de cavalo lisado + 0,1% β-NAD 20 mg/mL), de acordo com o protocolo padrão do EUCAST/BrCAST (BRCAST, 2021a; EUCAST, 2020). Para *N. gonorrhoeae*, foi utilizado o método de microdiluição do caldo, enquanto Blaskovich et al. (2021) utilizaram a metodologia de diluição em ágar. Além disso, Blaskovich et al. (2021) usaram como meio de cultura um caldo composto de uma porcentagem menor de sangue lisado de cavalo (3%) para *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*, e um caldo modificado de acordo com a *American Type Culture Collection* (ATCC) para *Neisseria* spp., que não contém sangue (BLASKOVICH et al., 2021). A presença de sangue na composição do meio de cultura (por exemplo, caldo MH-F) aumenta a CIM de CBD, como observado nos resultados deste estudo para *S. aureus* (CIM de CBD quatro diluições seriadas 1:2 maior

quando utilizado MH-F em comparação ao CMH) e em outras literaturas prévias (VAN KLINGEREN; TEN HAM, 1976). Estas diferenças podem ter contribuído para que os valores CIM de CBD contra bactérias fastidiosas fossem superiores aos valores apresentados por Blaskovich et al. (2021) (BLASKOVICH et al., 2021).

Com relação a *M. tuberculosis*, os resultados deste trabalho mostraram valores de CIM de CBD inferiores aos apresentados por Blaskovich et al. (2021), os quais utilizaram um período de incubação de 5 dias, adição de 12,5 µL de 20% de tween 80 na solução de resazurina e meio de cultura suplementado com ADC (albumina, dextrose, catalase) (Laboratórios Difco), 0,5% glicerol, e 0,02% tyloxapol (BLASKOVICH et al., 2021). Nos experimentos deste trabalho, foi utilizado um período de incubação de 7 dias, sem adição de tween 80 em resazurina, e meio de cultura suplementado com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose, catalase) e glicerol 0,4%. A diferença entre OADC e ADC é a presença de ácido oleico a 0,5g/L.

Os resultados deste trabalho reforçam que CBD por si só não é antibacteriano contra BGN (XDR, MDR ou sensíveis a antibióticos), visto que foram avaliadas 27 espécies (70 linhagens) de BGN envolvidas em IRAS, bem como em infecções comunitárias, expandindo o painel de BGN e patógenos humanos investigados: *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*, *Pantoea agglomerans*, *Cronobacter sakazakii*, *Providencia rettgeri*, *Salmonella enterica subsp. enteric (serovar Enteritidis)*, *Shigella flexneri*, *Plesiomonas shigelloides*, *Hafnia alvei*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica subsp. Enterocolitica*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas hydrophila*, e *Alcaligenes faecalis subsp. faecalis* (Tabela 1).

A partir dos experimentos deste estudo, não foi observado papel das bombas de efluxo, comumente envolvidas na extrusão de antibióticos da célula gram-negativa, na ausência de atividade do CBD nessas bactérias. Assim, também sugere-se que o CBD sozinho não possui atividade antibacteriana nessas bactérias em decorrência da ausência ou baixa permeabilidade do CBD através do envelope celular (membrana externa) dos BGN.

A ausência de atividade antibacteriana do CBD contra BGN pode estar relacionada às moléculas de LPS e proteínas da membrana externa, o que levaria à impermeabilidade de macromoléculas e difusão limitada de moléculas hidrofóbicas, tais como CBD (BLASKOVICH et al., 2021; FARHA et al., 2020;

MARTINENGI et al., 2020). Os resultados da atividade antibacteriana do CBD *in vitro* contra bactérias gram-positivas e *M. tuberculosis*, e a ausência de atividade antibacteriana do CBD contra BGN, reforçam o papel do LPS em impedir ou dificultar a atividade do CBD.

Adicionalmente, foram avaliadas bactérias que expressam LOS, endotoxinas estruturalmente distintas do LPS nas quais o antígeno O está ausente (*N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* e *M. catarrhalis*) (PENG et al., 2005; PRESTON et al., 1996). Assim, a atividade antibacteriana do CBD contra essas bactérias poderia sugerir um papel específico do antígeno O na ausência de atividade antibacteriana do CBD em BGN (possivelmente associada a interações eletrostáticas ou mesmo a impedimentos estéreos ou espaciais decorrentes da presença do antígeno O).

Embora *A. baumannii* e *H. influenzae* também expressem moléculas de LOS em sua membrana externa, o core polissacarídeo destas bactérias apresenta uma composição polissacarídea diferente (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; PRESTON et al., 1996; VINOGRADOV et al., 2002). Este fato poderia explicar a ausência de atividade antibacteriana do CBD contra estas bactérias gram-negativas. CBD e canabigerol (CBG), outro canabinoide, têm atividade antibacteriana contra *A. baumannii* somente na ausência de todo o LOS, de acordo com estudos anteriores (BLASKOVICH et al., 2021; FARHA et al., 2020).

A estrutura química hidrofóbica do CBD (Figura 1) pode sugerir a interação da molécula com as membranas lipídicas, como descrito por Guard et al. (2021) para células eucarióticas, nas quais o CBD teria potencial de alterar as propriedades biofísicas da membrana e afetar o metabolismo de lipídeos e de colesterol (GUARD et al., 2021; GUZMÁN, 2003). Assim, em bactérias, o CBD poderia agir tal como um peptídeo antimicrobiano, ou seja, como uma substância com grupo catiônico e cauda hidrofóbica que tem a habilidade de perfurar membranas celulares bacterianas (YU et al., 2020). A membrana bacteriana também foi sugerida como um possível alvo bacteriano para os canabinoides (CBG e CBD) (BLASKOVICH et al., 2021; FARHA et al., 2020; MARTINENGI et al., 2020). Além disso, Blaskovich et al. (2021) também mostraram que concentrações bactericidas de CBD contra *S. aureus* levam à inibição da síntese de proteínas, DNA, RNA e peptidoglicanos (BLASKOVICH et al., 2021). No

entanto, os mecanismos de ação antibacteriana específicos do CBD ainda não foram totalmente elucidados.

Portanto, os resultados deste trabalho contribuem para uma melhor compreensão dos possíveis mecanismos de ação antibacteriana do CBD, o que orienta futuros estudos de caracterização molecular do(s) alvo(s) do CBD nas células bacterianas.

5.2. Atividade antibacteriana da combinação CBD + PB

Estudos anteriores relataram a atividade antibacteriana do CBD em combinação com a PB, embora apenas poucas espécies e linhagens bacterianas foram avaliadas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii*) (BLASKOVICH et al., 2021; FARHA et al., 2020). Resultados preliminares deste estudo, sobre a atividade antibacteriana da combinação CBD + PB (incluindo linhagens bacterianas resistentes aos carbapenêmicos e com resistência cromossômica, plasmideal ou intrínseca à PB), foram publicados no livro de resumos do 30º Congresso Europeu de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ECCMID 2020) e apresentados no World Microbe Forum 2021 (ABICHABKI et al., 2020, 2021).

Este trabalho fornece resultados da combinação CBD + PB contra várias linhagens de BGN (8 espécies, 48 linhagens), destacando os patógenos de prioridade crítica da lista da OMS para P&D de novos antibióticos, incluindo clones internacionais de alto risco MDR e XDR (por exemplo, *K. pneumoniae* ST 258 e ST 11 produtoras de KPC, *E. coli* ST 131 produtora de CTX-M-15, *P. aeruginosa* ST 277 produtora de SPM e *A. baumannii* ST 109 produtor de OXA-143) (Tabela 2).

Para a maioria dos BGN, os resultados a partir do *checkerboard* mostraram que concentrações de CBD iguais ou inferiores a 4 µg/mL foram as menores concentrações necessárias para a atividade antibacteriana na combinação CBD + PB. Além disso, concentrações de PB variando de uma até oito diluições seriadas 1:2 menores do que a CIM de PB foram suficientes para a atividade antibacteriana da combinação CBD + PB. Para as linhagens resistentes à PB (com destaque para *K. pneumoniae*), 2-4 µg/mL de CBD foram suficientes para levar à inibição do crescimento bacteriano quando combinadas com concentrações de PB ≤ 2 µg/mL (Tabela 4).

De acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo EUCAST/BrCAST, CIM de PB $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ é categorizada como sensível, e há alta probabilidade de sucesso terapêutico quando utilizado um regime de dosagem padrão de PB (BRCAST, 2021b; EUCAST, 2021b). Por outro lado, de acordo com os pontos de corte do CLSI, CIM de PB $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ é categorizada como intermediária, e não há mais uma categoria "sensível" para polimixina, também de acordo com o CLSI. O CLSI argumenta que a monoterapia com polimixinas apresentaria eficácia clínica limitada e sugere terapia combinada com outro antibacteriano (CLSI, 2020). Neste estudo, foi adotado o ponto de corte do EUCAST/BrCAST (CIM de PB $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ como sensível) para as análises e discussão.

Adicionalmente, os resultados dos ensaios de *time-kill* mostraram o efeito inibitório da combinação CBD + PB ao longo do tempo, contribuindo para futuros estudos e perspectivas sobre as relações dose-exposição e parâmetros farmacocinéticos/farmacodinâmicos.

Entre os BGN intrinsecamente resistentes à PB, a combinação de CBD + PB mostrou atividade antibacteriana apenas contra *E. tarda*. Estes resultados podem estar relacionados aos diferentes mecanismos de resistência intrínseca destas bactérias, envolvendo diferentes vias moleculares de sistemas de dois componentes (LV et al., 2012; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

Em relação aos resultados de *checkerboard* para os DGN, foi possível o cálculo do ICIF, pois houve determinação de CIM de CBD frente essas bactérias. Embora PB não seja utilizada no tratamento de infecções causadas por estes DGN, devido à resistência intrínseca, o efeito sinérgico observado pode sugerir um novo ponto de vista para a atividade da combinação CBD + PB, além de contribuir para a elucidação do mecanismo de ação do CBD.

5.3. Atividade biológica da combinação CBD + PB

CBD, sozinho, apresentou atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas, *M. tuberculosis* e DGN que expressam LOS. No entanto, não é antibacteriano contra BGN, provavelmente em decorrência da presença de moléculas de LPS e proteínas na membrana externa que levam à impermeabilidade do CBD.

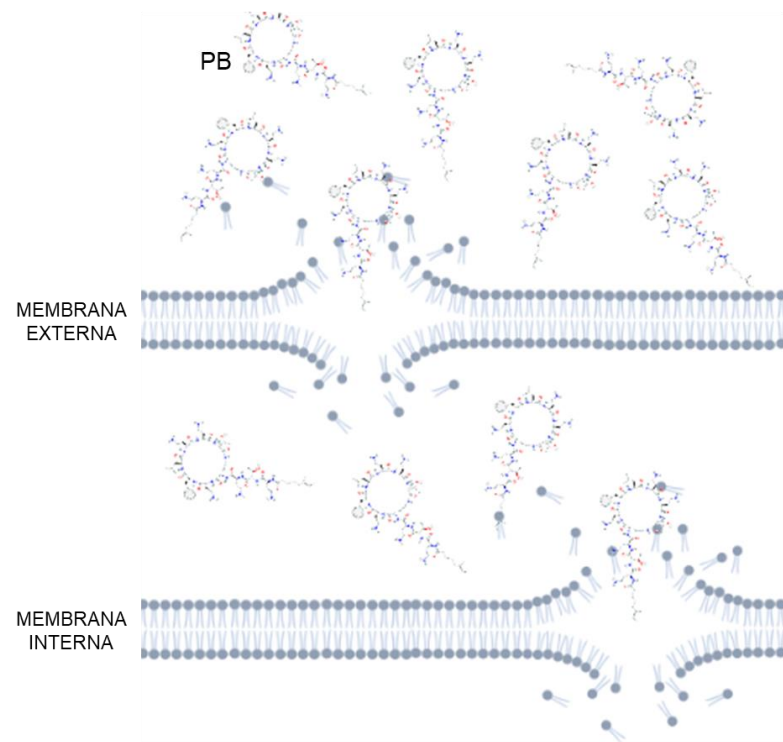
PB, sozinha, possui atividade antibacteriana (CIM) contra a maioria das bactérias gram-negativas. Entretanto, PB é sugerida clinicamente como

antimicrobiano de última escolha (em monoterapia ou combinada com outro antibiótico) e somente no tratamento de infecções por BGN (*Enterobacterales*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*) que não possuem resistência intrínseca à PB e quando valores de CIM de PB contra essas bactérias são $\leq 2\mu\text{g/mL}$, determinados laboratorialmente (BRCAST, 2021b; CLSI, 2020; EUCAST, 2021b). PB promove a desestabilização do LPS ou LOS e, em concentrações inibitórias e bactericidas, resulta na ruptura do envelope celular de bactérias gram-negativas provocando a morte bacteriana (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

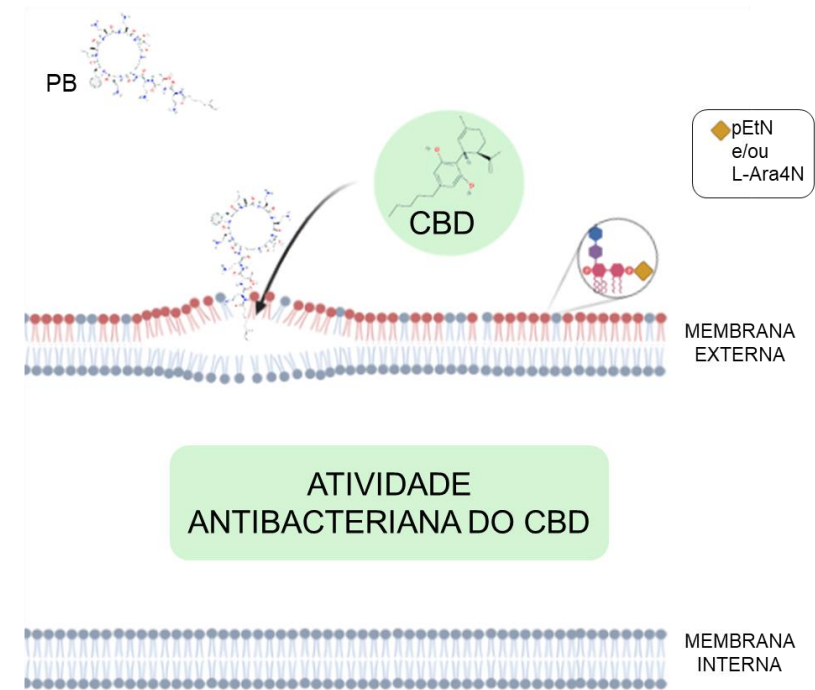
Considerando a atividade antibacteriana da combinação CBD + PB contra BGN, os resultados também apontam a existência de um alvo molecular do CBD em BGN e indicam que sua atividade é dependente da desestabilização da membrana externa promovida pela PB, mesmo em bactérias resistentes à PB (Figura 15).

Figura 15. Representação esquemática da atividade da CIM de PB e da CAEM de PB

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Polimixina B (PB)



B Concentração Antibiótica de Efeito Mínimo (CAEM) de Polimixina B (PB)



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com) 

Fonte: Autoria própria. Elaborado em BioRender.com.

CBD é o agente antibacteriano na combinação CBD + PB, considerando que as concentrações de PB utilizadas na combinação são CAEM de PB, que são subletais (subinibitórias). Este fato é suportado pelos resultados dos ensaios de *time-kill*, que mostraram que a curva de crescimento da bactéria na presença da CAEM de PB acompanhou a curva controle de crescimento da bactéria sem CBD ou PB (controle de crescimento) (Figura 10). Portanto, CBD não restaura a sensibilidade à PB em bactérias resistentes à PB, uma vez que as definições e conceitos de sensibilidade/resistência estão diretamente relacionados aos pontos de corte e valores de CIM de PB determinados pelo EUCAST/BrCAST e CLSI.

Surpreendentemente, a combinação CBD + PB foi efetiva contra isolados de *K. pneumoniae* resistentes à PB (CIM de PB variando entre 4 e 128 µg/mL), considerando resistentes as bactérias com CIM de PB > 2 µg/mL. Mais uma vez, este fato corrobora com a atividade antibacteriana do CBD, uma vez que as concentrações de PB na combinação são CAEM de PB (concentrações subletais).

Dessa forma, mais uma vez os dados deste estudo corroboram que o CBD não restaura a sensibilidade à PB em bactérias gram-negativas resistentes à PB. CAEM de PB somente age desestabilizando a membrana externa, porém sem causar ruptura ou morte bacteriana.

Além disso, o CBD não diminui a CIM de PB contra BGN, pois “CIM” é a “concentração inibitória mínima” de somente um agente antibacteriano (antibiótico sozinho), portanto, em combinação com outra substância, o conceito de redução da CIM é equivocado e não deve ser utilizado. As concentrações mais baixas de PB na combinação CBD + PB são as CAEMs de PB.

A categorização do efeito da combinação CBD + PB não pôde ser realizada somente com base nos resultados de *checkerboard*, uma vez que não foi possível a determinação de CIM de CBD contra BGN. Com isso, não é possível o cálculo matemático do ICIF, devido à ausência de valor a ser atribuído à CIM de CBD. Adicionalmente, também não seria correto utilizar os valores máximos de CBD avaliados como “CIM” para o cálculo matemático.

Entretanto, excluindo a atribuição de IFIC, neste caso, a técnica de *checkerboard* possibilitou a avaliação da combinação de CBD e PB em diferentes proporções (diferentes combinações de concentrações), indicando a mínima concentração de PB necessária (CAEM) para permitir a atividade antibacteriana do

CBD, assim como a mínima concentração de CBD necessária para que a combinação CBD + PB tenha efeito antibacteriano.

Considerando a ausência de atividade antibacteriana (ou ausência de determinação da CIM) de uma das substâncias na combinação de fármacos, a associação dos resultados de *checkerboard* e *time-kill* contribui para a melhor caracterização da atividade antibacteriana combinada dos dois fármacos. Os resultados do *checkerboard* mostram o quanto as concentrações das substâncias podem ser reduzidas enquanto ainda inibem o crescimento bacteriano, enquanto os dados obtidos pelo *time-kill* mostram o quão mais efetiva é a combinação quando comparada com a atividade de cada substância isoladamente. As informações referentes à inibição bacteriana pela combinação apresentadas pelo *checkerboard* são importantes, no entanto, as informações obtidas pelo *time-kill* são mais aplicadas na categorização do efeito da combinação como sinérgica (BRENNAN-KROHN; KIRBY, 2019a).

Os resultados mostraram que baixas concentrações de PB ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$ e também menores que a CIM de PB contra cada BGN avaliado) são suficientes para levar à mínima desestabilização da membrana externa, que é necessária para a atividade antibacteriana do CBD em BGN (com exceção de *P. aeruginosa* e *E. coli* com resistência à PB mediada por plasmídeo [MCR-1]).

A combinação CBD + PB + PA β N foi efetiva contra *P. aeruginosa* e *E. coli* MCR-1, para as quais somente CBD + PB não havia apresentado atividade. No entanto, estes resultados não são relacionados à atividade de inibição de efluxo conferida pelo PA β N, visto que o CBD não foi antibacteriano contra BGN mesmo na presença de PA β N. Portanto, os resultados deste trabalho sugerem o aumento da permeabilidade da membrana externa em decorrência da presença do PA β N, o que contribui para a atividade do CBD. O efeito do PA β N levando a maior permeabilidade da membrana bacteriana foi similarmente descrito para a combinação com antibióticos beta-lactâmicos contra *P. aeruginosa*, assim como para a sensibilização de *P. aeruginosa* a antibióticos que não são capazes de cruzar a membrana externa de BGN e não teriam atividade (por exemplo, vancomicina) (LAMERS; CAVALLARI; BURROWS, 2013). Adicionalmente, para todas as bactérias avaliadas, a presença de PA β N possibilitou que as concentrações de PB na combinação CBD + PB fossem consideravelmente menores (Tabela 4).

PA β N é uma substância comumente utilizada na inibição de bombas de efluxo em experimentos *in vitro*, não sendo utilizado atualmente na prática clínica devido à sua citotoxicidade. Entretanto, PA β N tem sido sugerido como potencial adjuvante na terapia antimicrobiana, a fim de reduzir dosagens de fármacos já utilizados que requeiram maior permeabilidade da membrana externa para melhor atividade antibacteriana (FERRER-ESPADA et al., 2019; SHARMA; GUPTA; PATHANIA, 2019).

5.4. Perspectivas farmacocinéticas do reposicionamento do CBD como antibacteriano

De acordo com o *Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System*, CBD é um medicamento classe 2, com baixa solubilidade em água e alta permeabilidade/metabolismo dependente das enzimas CYP3A4, CYP2C19, UGT1A9 e UGT2B7 (PERUCCA; BIALER, 2020).

A farmacocinética clínica do CBD após a administração oral foi avaliada em estudos com diferentes formulações como cápsulas, soluções e preparações oromucosais. No entanto, os autores destacam a escassez de informações e chamam a atenção para alguns dados discrepantes entre diferentes estudos (MILLAR et al., 2018, 2020).

A administração intravenosa (IV) é a via de administração mais utilizada na terapia antimicrobiana em pacientes graves, e os parâmetros farmacocinéticos do CBD após a administração IV foram avaliados em ensaios clínicos (MILLAR et al., 2020). A farmacocinética da CBD após uma dose IV de 20 mg foi avaliada por um estudo anterior, que mostrou valores de *clearance* de aproximadamente 80 L/h e volume de distribuição de 52 L em indivíduos de 70 kg (MECHOULAM; PARKER; GALLILY, 2002). Assim, um exercício de farmacocinética translacional poderia ser feito por meio da equação clássica, considerando farmacocinética linear:

$$\text{Dose/ T} = \text{CL} \times \text{C}_{\text{ss}}$$

Sendo que T representa o intervalo de dosagem, CL é o *clearance* e C_{ss} representa a concentração plasmática média no estado de equilíbrio.

Como apresentado, CBD é antibacteriano contra a maioria dos cocos gram-positivos (por exemplo, *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.) com CIM *in vitro*

de 2 µg/mL ou 4 µg/mL. Entretanto, CBD não é antibacteriano contra BGN. No entanto, a combinação de CBD + PB é antibacteriana contra BGN, incluindo cepas padrão, isolados clínicos, MDR e XDR. Para a maioria dos BGN, baixas concentrações de PB (CAEM, que são inferiores à CIM de PB; e ≤ 2 µg/mL) permitem que o CBD (≤ 4 µg/mL) exerça atividade antibacteriana contra BGN, especialmente contra BGN resistentes à PB (por exemplo, *K. pneumoniae*). Para alcançar estas concentrações plasmáticas, considerando os dados da literatura, uma administração IV de CBD de aproximadamente 2g/12h ou 4g/12h resultaria em exposição plasmática maior que a CIM (C_{ss}) contra bactérias gram-positivas (CBD sozinho) e BGN (na combinação CBD + PB).

Considerando essas concentrações plasmáticas alvo e os valores de *clearance* descritos previamente, seria possível a administração do CBD em doses que atinjam concentrações plasmáticas acima da CIM, já que doses únicas de até 6g foram descritas como bem toleradas (PERUCCA; BIALER, 2020; TAYLOR et al., 2018).

Até o momento, os dados farmacocinéticos para CBD na literatura referem-se a outro contexto terapêutico (epilepsia farmacorresistente ou tratamento de epilepsia refratária), relacionado à administração oral e a diferentes doses, determinadas por estudos clínicos específicos para a finalidade terapêutica descrita. Este trabalho demonstra a atividade antibacteriana do CBD *in vitro*, particularmente em combinação com a PB, sugerindo o potencial reposicionamento do CBD como antibacteriano. Para atingir este objetivo, são necessárias pesquisas e desenvolvimento de novas formulações de CBD a fim de otimizar a farmacocinética da CBD para alcançar concentrações séricas mais elevadas a partir da administração segura das dosagens necessárias para a terapia antibacteriana. Os resultados deste estudo, juntamente com novas formulações de CBD, apresentam um potencial translacional a ser validado por futuros estudos clínicos com o intuito de tratar infecções bacterianas.

Neste contexto, a otimização da administração IV de CBD e dos parâmetros farmacocinéticos poderia ser alcançada com formulações que utilizem estratégias baseadas em nanopartículas, utilizando nanocarreadores para aumentar a solubilidade, estabilidade e eficácia do CBD para a terapia antibacteriana (MAKABENTA et al., 2021).

São ainda necessários estudos futuros sobre farmacocinética e farmacodinâmica, segurança e tolerabilidade do CBD, sozinho ou na combinação CBD + PB. Destaca-se o promissor potencial translacional da CBD como antibacteriano, principalmente na combinação CBD + PB contra GNB, no tratamento de infecções bacterianas graves causadas por bactérias MDR ou XDR, com destaque contra *K. pneumoniae* resistente à PB.

5.5. Perspectivas clínicas do reposicionamento do CBD como antibacteriano

Várias abordagens têm sido utilizadas para compreender melhor e combater mais eficientemente a resistência bacteriana aos antibióticos, principalmente contra MDR/XDR e BGN resistentes à PB. O reposicionamento de fármacos representa uma abordagem mais rápida para identificar novos antimicrobianos, uma vez que os parâmetros pré-clínicos e clínicos destes medicamentos já estão estabelecidos (ZHENG; SUN; SIMEONOV, 2018). Assim, a atividade antibacteriana do CBD poderia ser considerada para seu reposicionamento como antibiótico e para avaliação em estudos clínicos (por exemplo, em uso compassivo ou acesso expandido) inicialmente contra infecções graves ou que representem risco à vida do paciente (ANVISA, 2013; JAROW et al., 2017).

CBD poderia ser avaliado contra infecções causadas por:

- (i) VISA e XDR (também otimizando parâmetros farmacocinéticos/farmacodinâmicos [PK/PD] de uso clínico da vancomicina);
- (ii) *M. tuberculosis* XDR (também usando em combinação com tuberculostático).

Além disso, combinações de novas substâncias antibacterianas e antibióticos já utilizados na prática clínica poderiam ser uma alternativa para tratar infecções bacterianas causadas por bactérias com resistência simultânea a carbapenêmicos, aminoglicosídeos, polimixinas e tigeciclina (CAPT-resistentes) (KARAKONSTANTIS; KRITSOTAKIS; GIKAS, 2020). Assim, a atividade antibacteriana da combinação CBD + PB também pode ser explorada contra infecções causadas por BGN resistentes à PB, para as quais outras opções de antibióticos são ineficazes:

(i) CRE (por exemplo, *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase [KPC]), resistentes a ceftazidime-avibactam, CAPT resistente e MDR/XDR;

(ii) CRAB (para o qual ceftazidime-avibactam é ineficaz) e MDR/XDR;

(iii) bactérias pandroga-resistentes (PDR) (MAGIORAKOS et al., 2012).

Conclusões

6. Conclusões

- Canabidiol (CBD) apresentou atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas, diplococos gram-negativos que expressam lipo-oligossacarídeo (*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* e *Moraxella catarralis*) e *Mycobacterium tuberculosis*, porém ausência de atividade contra bacilos gram-negativos.
- CBD não possui atividade antibacteriana contra bacilos gram-negativos mesmo na presença de inibidores de bombas de efluxo, sugerindo que efluxo não é responsável pela ausência de atividade antibacteriana.
- Para a maioria dos bacilos gram-negativos estudados, os resultados obtidos mostraram que baixas concentrações de polimixina B (PB) ($\leq 2 \mu\text{g/mL}$) permitem que o CBD ($\leq 4 \mu\text{g/mL}$) exerça atividade antibacteriana contra bacilos gram-negativos, incluindo linhagens resistentes à PB.
- Para *P. aeruginosa* ATCC 27853 e HC103 (linhagens sensíveis à PB) e para as linhagens *E. coli* NCTC 13846 e 72H (produtoras de MCR-1), a combinação CBD + PB foi antibacteriana apenas na presença de PA β N.
- Em diplococos gram-negativos, a combinação CBD + PB apresentou efeitos aditivo e/ou sinérgico.
- Para isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes à PB, a combinação CBD + PB é mais efetiva e leva à maior inibição do crescimento bacteriano em comparação ao CBD e PB sozinhos (nas concentrações avaliadas).
- Os resultados apresentados mostram potencial translacional e sugerem que o CBD poderia ser considerado para reposicionamento como antibacteriano, especialmente na combinação CBD + PB para isolados de *K. pneumoniae* resistentes à PB.

Referências

7. Referências

ABICHABKI, N. et al. **Cannabidiol synergic antimicrobial activity combined with polymyxin B (PB) against PB susceptible and resistant Gram-Negative bacilli.** 30th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2020. **Anais...**2020

ABICHABKI, N. et al. **In Vitro Antibacterial Efficacy of Cannabidiol Plus Polymyxin B: Mixed and Together Against Multidrug-resistant and Polymyxin B-resistant Gram-negative Bacilli.** World Microbe Forum Abstracts. **Anais...**2021Disponível em: <<https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/9286/presentation/4811>>. Acesso em: 14 out. 2021

ANDRADE, L. N. et al. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2530–2535, 2014.

ANDRADE, L. N. et al. **Antimicrobial Activity of Cannabidiol against Escape Pathogens: Inhibitory and Bactericidal Activity against Vancomycin- Resistant *Enterococcus faecium*, Vancomycin- Intermediate *Staphylococcus aureus*, and Methicillin-Resistant *S. Aureus*.** ASM MICROBE 2018. **Anais...**Atlanta: 2018

ANVISA. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 38, DE 12 DE AGOSTO DE 2013 Aprova o regulamento para os programas de acesso expandido, uso compassivo e fornecimento de medicamento pós-estudo.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 2013. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0038_12_08_2013.html>

ANVISA. **Anvisa autoriza primeiro produto à base de Cannabis.** Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/anvisa-autoriza-primeiro-produto-a-base-de-cannabis>>. Acesso em: 3 out. 2020.

ANVISA. **Anvisa aprova mais um produto medicinal à base de Cannabis.** Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-aprova-mais-um-produto-medicinal-a-base-de-cannabis>>. Acesso em: 15 nov. 2021.

APPENDINO, G. et al. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: A structure-activity study. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1427–1430, 2008.

ARAOKA, H. et al. Evaluation of trimethoprim-sulfamethoxazole based combination therapy against *Stenotrophomonas maltophilia*: in vitro effects and clinical efficacy in

cancer patients. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 58, p. 18–21, 2017.

ÅRDAL, C. et al. Antibiotic development — economic, regulatory and societal challenges. **Nature Reviews Microbiology**, 2019.

BAQUERO, F. et al. Evolutionary Pathways and Trajectories in Antibiotic Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, 2021.

BAQUERO, F.; COQUE, T. M. Widening the spaces of selection: Evolution along sublethal antimicrobial gradients. **mBio**, v. 5, n. 6, p. 5–7, 2014.

BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 583–591, 2016.

BLASKOVICH, M. A. T. et al. The antimicrobial potential of cannabidiol. **Communications Biology**, n. 2021, 2021.

BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy : time-kill , checkerboard , and E test . Downloaded from <http://aac.asm.org/> on September 3 , 2013 by Universidade Federal do Rio Grande do Sul Comparison of Three Different In Vitro Met. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914–1918, 1996.

BRCAST. **Preparo de meios para o teste de disco-difusão do BrCAST-EUCAST e para a determinação dos valores de concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo**, 2021a.

BRCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST**, v. 11, p. 37–40, 2021b.

BRCAST. Controle interno de qualidade de rotina e estendido para a determinação da CIM e Disco-Difusão conforme recomendações do BrCAST-EUCAST. 2021c.

BRENNAN-KROHN, T.; PIRONTI, A.; KIRBY, J. E. Synergistic Activity of Colistin-Containing Combinations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. 1–11, 2018.

BRENNAN-KROHN, T.; KIRBY, J. E. When One Drug Is Not Enough: Context, Methodology, and Future Prospects in Antibacterial Synergy Testing. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 39, n. 3, p. 345–358, 2019a.

BRENNAN-KROHN, T.; KIRBY, J. E. Antimicrobial synergy testing by the inkjet printer-assisted automated checkerboard array and the manual time-kill method. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2019, n. 146, p. 2–3, 2019b.

CASSANO, T. et al. From Cannabis sativa to Cannabidiol: Promising Therapeutic Candidate for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. March, p. 1–10, 2020.

CHENG, Y. S.; WILLIAMSON, P. R.; ZHENG, W. **Improving therapy of severe infections through drug repurposing of synergistic combinations** **Current Opinion in Pharmacology** Elsevier Ltd, , 1 out. 2019.

CLÍMACO, E. C. et al. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 127–133, 2013.

CLSI. **CLSI M100-ED30:2020 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition**. Disponível em: <<http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx>>. Acesso em: 29 jul. 2020.

CRIPPA, J. A. et al. Translational investigation of the therapeutic potential of cannabidiol (CBD): Toward a new age. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. SEP, p. 1–16, 2018.

DAS, S.; DASGUPTA, A.; CHOPRA, S. Drug repurposing: A new front in the war against *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 1091–1099, 2016.

DOERN, C. D. When Does 2 Plus 2 Equal 5? A Review of Antimicrobial Synergy Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4124–4128, 2014.

EUCAST. **Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, , 2020.

EUCAST. **Antimicrobial susceptibility testing**. Disponível em: <https://eucast.org/ast_of_bacteria/>. Acesso em: 20 out. 2021a.

EUCAST. **Clinical breakpoints - bacteria (v 11.0)** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, , 2021b.

EUCAST. **Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacteria**. Disponível em: <<https://www.eucast.org/mycobacteria/>>. Acesso em: 16 nov. 2021c.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. An overview of Epidyolex and why it is authorised in the EU. n. 0, 2019.

FARHA, M. A. et al. Uncovering the Hidden Antibiotic Potential of Cannabis. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 3, p. 338–346, 2020.

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. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 17, p. 1–6, 2016.

FERRER-ESPADA, R. et al. A permeability-increasing drug synergizes with bacterial efflux pump inhibitors and restores susceptibility to antibiotics in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

FOERSTER, S. et al. A new rapid resazurin-based microdilution assay for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 7, p. 1961–1968, 2017.

GALETTI, R. et al. Genomic diversification and virulence features in SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* 13 years later. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 2, p. 179–180, 2015.

GUARD, S. E. et al. Multi-Omic Analysis Reveals Disruption of Cholesterol Homeostasis by Cannabidiol in Human Cell Lines. **bioRxiv**, p. 2020.06.03.130864, 1 jan. 2021.

GUZMÁN, M. Cannabinoids: Potential anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 745–755, 2003.

HARDING, C. M.; HENNON, S. W.; FELDMAN, M. F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 91–102, 2018.

JAROW, J. P. et al. Overview of FDA 's Expanded Access Program for Investigational Drugs. **Therapeutic Innovation & Regulatory Science**, v. 51, n. 2, p. 177–179, 2017.

KABELIK, V. J. Hanf (*Cannabis sativa*); Antibiotisches Heilmittel. I. Hanf in der Alt- und Volksmedizin. **Die Pharmazie**, v. 12, n. 7, p. 439–443, 1957.

KARAKONSTANTIS, S.; KRITSOTAKIS, E. I.; GIKAS, A. Treatment options for *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* co-resistant to carbapenems, aminoglycosides, polymyxins and tigecycline: an approach based on the mechanisms of resistance to carbapenems. **Infection**, v. 48, n. 6, p. 835–851, 2020.

KAUL, G. et al. Update on drug-repurposing: Is it useful for tackling antimicrobial resistance? **Future Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 829–831, 2019.

KOSGODAGE, U. S. et al. Cannabidiol Is a Novel Modulator of Bacterial Membrane Vesicles. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. September, p. 1–13, 2019.

KREJCI, Z. Hanf (*Cannabis sativa*) - Antibiotisches Heilmittel. 2. Mitteilung: Methodik

und Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen und vorläufige klinische Erfahrungen. **Die Pharmazie**, v. 13, n. 3, p. 155–166, mar. 1958.

LAMERS, R. P.; CAVALLARI, J. F.; BURROWS, L. L. The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PAβN) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–7, 2013.

LESCAT, M. et al. A Resazurin Reduction-Based Assay for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 1–6, 2019.

LI, L. et al. Insight into synergetic mechanisms of tetracycline and the selective serotonin reuptake inhibitor, sertraline, in a tetracycline-resistant strain of *Escherichia coli*. **Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 9, p. 944–953, 2017.

LUCAS, C. J.; GALETTIS, P.; SCHNEIDER, J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 11, p. 2477–2482, 2018.

LV, Y. et al. Systematic mutation analysis of two-component signal transduction systems reveals EsrA-EsrB and PhoP-PhoQ as the major virulence regulators in *Edwardsiella tarda*. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 1–2, p. 190–199, 2012.

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, 2012.

MAKABENTA, J. M. V. et al. Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 23–36, 2021.

MARTINENGI, L. D. et al. Isolation, Purification, and Antimicrobial Characterization of Cannabidiolic Acid and Cannabidiol from *Cannabis sativa* L. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2020.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A.; GALLILY, R. Cannabidiol: An overview of some pharmacological aspects. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 11 SUPPL., p. 11–19, 2002.

MILLAR, S. A. et al. A systematic review on the pharmacokinetics of cannabidiol in humans. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, 2018.

MILLAR, S. A. et al. Towards Better Delivery of Cannabidiol (CBD). **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 9, p. 219, 28 ago. 2020.

MIYATA, M. et al. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil: Phenotypic and genotypic methods. **Biomedicine and**

Pharmacotherapy, v. 65, n. 6, p. 456–459, 2011.

NANG, S. C. et al. Rescuing the last-line polymyxins: Achievements and challenges. **Pharmacological Reviews**, v. 73, n. 2, p. 679–728, 2021.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 644019, Cannabidiol**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cannabidiol>>. Acesso em: 24 nov. 2021.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1–11, 2003.

PACIOS, O. et al. Strategies to Combat Multidrug-Resistant and. **Antibiotics**, v. 9, n. 65, p. 1–20, 2020.

PALMEIRO, J. K. et al. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Brazilian Tertiary Hospital. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. July, p. 1–11, 2019.

PALOMINO, J. et al. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PENDLETON, J. N.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 3, p. 297–308, 2013.

PENG, D. et al. *Moraxella catarrhalis* bacterium without endotoxin, a potential vaccine candidate. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 11, p. 7569–7577, 2005.

PERUCCA, E.; BIALER, M. Critical Aspects Affecting Cannabidiol Oral Bioavailability and Metabolic Elimination, and Related Clinical Implications. **CNS Drugs**, n. 0123456789, 2020.

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 557–596, 2017.

PRESTON, A. et al. The Lipooligosaccharides of Pathogenic Gram-Negative Bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 139–180, 25 jan. 1996.

RICE, L. B. Antimicrobial Stewardship and Antimicrobial Resistance. **Medical Clinics of North America**, v. 102, n. 5, p. 805–818, 2018.

SCHNEIDER, E. K. et al. Antibiotic–non-antibiotic combinations for combating extremely drug-resistant Gram-negative ‘superbugs’. **Essays In Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 115–125, 2017.

SHARMA, A.; GUPTA, V.; PATHANIA, R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. **Indian Journal of Medical Research**, v. 149, n. 2, p. 129, 2019.

STASIŁOWICZ, A. et al. Cannabis sativa L. As a natural drug meeting the criteria of a multitarget approach to treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 1–31, 2021.

SULLIVAN, G. J. et al. How antibiotics work together: molecular mechanisms behind combination therapy. **Current Opinion in Microbiology**, v. 57, p. 31–40, 2020.

SULTAN, A. S.; MARIE, M. A.; SHEWEITA, S. A. Novel mechanism of cannabidiol-induced apoptosis in breast cancer cell lines. **Breast**, v. 41, p. 34–41, 2018.

SUNDARAMOORTHY, N. S.; SIVASUBRAMANIAN, A.; NAGARAJAN, S. Simultaneous inhibition of MarR by salicylate and efflux pumps by curcumin sensitizes colistin resistant clinical isolates of Enterobacteriaceae. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, p. 104445, nov. 2020.

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.

TAMMA, P. D. et al. Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR- P. aer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 7, p. 1109–1116, 2021.

TÄNGDÉN, T. et al. Assessment of early combination effects of colistin and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in dynamic time-kill experiments. **Infectious Diseases**, v. 49, n. 7, p. 521–527, 2017.

TAYLOR, L. et al. A Phase I , Randomized , Double - Blind , Placebo - Controlled , Single Ascending Dose , Multiple Dose , and Food Effect Trial of the Safety , Tolerability and Pharmacokinetics of Highly Purified Cannabidiol in Healthy Subjects. **CNS Drugs**, v. 32, n. 11, p. 1053–1067, 2018.

THEURETZBACHER, U. et al. The global preclinical antibacterial pipeline. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. May, p. 275–285, 2019.

THEURETZBACHER, U. et al. Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. May, 2020.

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA Regulation of Cannabis and Cannabis-Derived Products, Including Cannabidiol (CBD)**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-regulation-cannabis-and-cannabis-derived-products-including-cannabidiol-cbd>>. Acesso em: 3 out. 2020.

VALIM BRIGANTE, T. A. et al. Cannabidiol did not induce teratogenicity or neurotoxicity in exposed zebrafish embryos. **Chemico-Biological Interactions**, v. 291, n. February, p. 81–86, 2018.

VAN BELKUM, A. et al. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. **Nature Reviews Microbiology**, 2020.

VAN KLINGEREN, B.; TEN HAM, M. Antibacterial activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 42, n. 1–2, p. 9–12, 1976.

VINOGRADOV, E. V. et al. The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 422–430, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **2019 Antibacterial Agents in Clinical Development**. [s.l.] WHO, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization Model List of Essential Medicines – 22nd List** Geneva World Health Organization, , 2021. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_India/en/>

Y. MAHMOOD, H. et al. Current Advances in Developing Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 1062–1081, 7 abr. 2016.

YIM, G.; HUIMI WANG, H.; DAVIES, J. The truth about antibiotics. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 2–3, p. 163–170, 2006.

YU, T. et al. Circumventing antimicrobial-resistance and preventing its development in novel, bacterial infection-control strategies. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 00, n. 00, p. 1–14, 2020.

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 2, p. 181–191, 2018.

ZHU, M. et al. The future of antibiotics begins with discovering new combinations. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1496, n. 1, p. 82–96, 2021.

ZUARDI, A. W. et al. A Critical Review of the Antipsychotic Effects of Cannabidiol: 30 Years of a Translational Investigation. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 32, p. 5131–5140, 2012.

