

**FABÍOLA FERNANDES DOS SANTOS CASTRO**

**Identificação e avaliação da atividade antimicrobiana de um novo  
peptídeo isolado da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha*  
contra bactérias multirresistentes.**

**BRASÍLIA, 2013**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**FABÍOLA FERNANDES DOS SANTOS CASTRO**

**Identificação e avaliação da atividade antimicrobiana de um novo  
peptídeo isolado da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha*  
contra bactérias multirresistentes.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo  
programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da  
universidade da Brasília.

**Orientador: Professora Doutora Márcia Renata Mortari**

**BRASÍLIA, 2013**

## RESUMO

O surgimento de bactérias resistentes pode ser observado desde a introdução na prática clínica, dos primeiros agentes antimicrobianos. Desde então, a rápida disseminação destes patógenos multirresistentes tem representado uma séria ameaça, considerando-se fatores como as altas taxas de mortalidade, a restrição de tratamentos e a alta prevalência de bactérias resistentes aos antimicrobianos no ambiente hospitalar. Até o momento, são considerados, pela comunidade científica internacional, patógenos multirresistentes causadores de infecções/colonizações relacionadas à assistência em saúde: *Enterococcus spp* resistente aos glicopeptídeos, *Staphylococcus spp.* resistente ou com sensibilidade intermediária a vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, e Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ertapenem, meropenem ou imipenem), destacando-se entre estas a *Klebsiella pneumoniae* e as espécies de *Enterobacter, spp.* Os peptídeos antimicrobianos (PAM), são capazes de exercer uma atividade antimicrobiana potente contra diferentes e numerosos micro-organismos, além da grande vantagem de não apresentar nenhuma toxicidade às células animais, ou uma toxicidade extremamente baixa. Neste contexto, o estudo de peptídeos isolados da peçonha de artrópodes peçonhentos tem apresentado um grande potencial. Vespas sociais produzem peptídeos com atividade muito superior, até dezoito vezes maior, que espécies solitárias, os quais agem como barreira inicial contra a invasão microbiana das colônias. A peçonha de vespas sociais é constituída por uma variedade de compostos bioativos, com diversas ações farmacológicas, entre elas a antimicrobiana. Neste trabalho foi feita uma avaliação da atividade antimicrobiana de um novo peptídeo isolado da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha*, em testes de inibição do crescimento bacteriano de cepas sensíveis e multirresistentes, gram negativas e gram positivas, por metodologia de disco difusão e microdiluição em caldo, comparando os resultados aos do desempenho de antimicrobianos convencionais utilizados na última linha de tratamento de infecções graves. Isolou-se um peptídeo de pequeno tamanho, de cadeia linear, que demonstrou potente atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e gram negativas. O peptídeo descrito nesta pesquisa apresenta atividade contra bactérias padrão, conhecidamente sensíveis aos antibióticos comerciais, não portadoras de genes de resistência, e também sobre cepas multirresistentes, nestas últimas em concentrações inferiores a 1µg/mL. A capacidade de inibição do crescimento bacteriano foi maior e mais potente nas cepas com expressão de elaborados mecanismos de resistência. O estudo da peçonha de vespas tem proporcionado uma gama de novos compostos, com ações farmacológicas diferenciadas e que podem ser utilizados como fármacos modelo para o desenvolvimento de novos antimicrobianos.

PALAVRAS CHAVES: Peptídeo Antimicrobiano; Bactérias Multirresistentes, Vespas Sociais.

## ABSTRACT

The emerging of multi-drug resistant bacteria can be observed since the introduction of clinical practice of the first antimicrobial agents. Ever since, the rapid spread of these multi-drug resistant pathogens is representing a serious threat, considering factors such as high rates of mortality, treatment restrictions and high prevalence of multi-drug resistant bacteria into the hospital environment. Nowadays, the scientific community considers as multi-drug resistant, the pathogens which are able to cause infections/colonizations related to health assistance: glycopeptides resistant *Enterococcus* spp; vancomycin resistant or reduced susceptibility *Staphylococcus* spp; *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and carbapenem-resistant enterobacterias (ertapenem, imipenem or meropenem), among those, highlighting *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. The antimicrobial peptides (PAM) are capable of produce a powerful antimicrobial activity against different and various microorganisms, also presenting the great advantage of having no toxicity consequences to animal cells, or an extremely low toxicity. In this sense, the study of those peptides isolated from the venom of poisonous arthropods has shown a great potential. Social wasps can produce peptides with a much higher superiority, up to eighteen times more, than lonely species, which act as an initial barrier against microbial invasion of the colonies. The venom of social wasps comprises a variety of bioactive compounds, with many pharmacologic actions, including antimicrobial. In this study, an evaluation of the antimicrobial activity of a new peptide isolated from the venom of the social wasp *Polybia dimorpha* was made, with bacterial inhibition of growth tests using strains of multi-drug resistant gram-negative and gram-positive bacteria, by disk-diffusion and microdilution methodology, comparing the results with the performance from conventional antimicrobial used in the last line treatment for severe infections. An small-sized, straight chained peptide was isolated, demonstrating a powerful antimicrobial activity against both gram-negative and gram-positive bacteria. The described peptide in this research represented activity against standard strains (noncarriers of multi-resistance genes), recognizably sensible against commercialized antimicrobials, and also against multi-drug resistant strains, at concentrations less than 1µg/mL. The bacterial growth inhibition capacity was greater and more powerful in the strains representing more elaborated resistance mechanism expression. The study of the wasps venom is providing a series of new compounds, with differentiated pharmacology actions which can be used as model drugs for the development of new antimicrobials.

KEY-WORDS: Antimicrobial Peptide, Multi-drug resistant Bacterias, Social Wasps

## Lista de Figuras

Figura 1: Modelos representativos das diferenças estruturais entre as quatro classes de peptídeos antimicrobianos. Todas as estruturas foram obtidas livremente da Protein Data Bank RCSB (PDB) ( <a href="http://www.pdb.org/">http://www.pdb.org/</a> ).....	27
Figura 2: Os diversos mecanismos de ação propostos para peptídeos antimicrobianos em células microbianas .....	28
Figura 3: Foto de exemplar de uma fêmea de <i>Polybia dimorpha</i> (foto de Fernando B. Noll).....	32
Figura 4: Perfil cromatográfico da peçonha da vespa <i>P. dimorpha</i> .....	40
Figura 5: Espectro de massa da fração selecionada, sendo visível o peptídeo majoritário [M+H] <sup>+</sup> = 2441,8. ....	42
Figura 6: Sequenciamento <i>de novo</i> do peptídeo isolado da fração Poly 12.....	43
Figura 7: Taxa de inibição de crescimento de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> pelo peptídeo identificado da peçonha da vespa social <i>Polybia dimorpha</i> . R2=0,7253. ....	47
Figura 8: Taxa de inibição de crescimento de bactérias <i>Enterococcus faecalis</i> pelo peptídeo identificado da peçonha da vespa social <i>Polybia dimorpha</i> . R2=0,9125. ....	47
Figura 9: Taxa de inibição de crescimento de bactérias <i>Escherichia coli</i> pelo peptídeo identificado da peçonha da vespa social <i>Polybia dimorpha</i> . R2=0,8538. ....	48
Figura 10: Taxa de inibição de crescimento de bactérias <i>Acinetobacter baumannii</i> pelo peptídeo identificado da peçonha da vespa social <i>Polybia dimorpha</i> . R2= 0,9414. ....	49
Figura 11: Taxa de inibição de crescimento de bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pelo peptídeo identificado da peçonha da vespa social <i>Polybia dimorpha</i> . R2= 0,6593. ....	49

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Resposta nos testes de disco difusão e microdiluição em caldo.....	45
Tabela 2: Comparação entre MIC50 e MIC100 em Cepas Padrão .....	46
Tabela 3:Taxa de Inibição de Fármacos antimicrobianos comerciais avaliados contra cepas padrão ATCC .....	51
Tabela 4: Taxa de inibição de fármacos comerciais contra bactérias multirresistentes (MDR). .....	53
Tabela 5: Comportamento das Cepas MDR, frente ao peptídeo.....	55

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ALA –Alanina

AMPC – Betalactamases induzíveis do tipo amp C

ANVISA– Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARG – Arginina

ATCC - *American Type Culture Collection*

BGN – Bacilos Gram Negativos

BGNF – Bacilos Gram Negativos Não Fermentadores

BHI–*Brain Heart Infusion*

CA-MRSA –*Community-associated* MRSA

CGP – Cocos Gram Positivos

CLAE –Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLSI–*Clinical and Laboratory Standards Institute*

CYS – Cisteína

DMSO – Dimetilssulfóxido

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzima imuno ensaio)

ESBLs–Beta-lactamases de espectro estendido

ESKAPE –*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter sp.*

GLY – Glicina

HA-MRSA –*Health-associated* MRSA

IBAMA– Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

IDSA – *Infectious Diseases Society of America*

IMP – Imipenemase

KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LPS – Lipopolissacáride

MALDI-TOF/TOF – *Matrix assisted laser desorption/ionization – Time of Flight*

MET – Metionina

MRSA–*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MS –*Mass spectrometry* Espectros de massa

PAM – Peptídeos Antimicrobianos

PVL – Panton Valentine Leucocidina

SIM–Seul imipenemase

TFA – Ácido Trifluoroacético

UNESP– Universidade Estadual Paulista

UNICEUB– Centro Universitário de Brasília

UTIs – Unidades de Terapia Intensiva

VIM –Verona imipenemase

VRE – *Enterococcus* resistente a vancomicina

## Sumário

1. Introdução .....	8
1.1. Patógenos “ESKAPE” .....	11
1.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11
1.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de betalactamase de espectro estendido(ESBL) e carbapenemase do tipo (KPC) .....	15
1.1.3. <i>Acinetobacter spp</i> .....	19
1.1.4. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	20
1.1.5. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
1.2. Peptídeos Antimicrobianos (PAM) .....	25
1.3. PeptídeosAntimicrobianos de Vespas.....	29
2. Objetivos .....	31
2.1. Objetivo Geral .....	31
2.2. Objetivos específicos .....	31
3. Materiale Métodos.....	32
3.1. Coleta.....	32
3.2. Preparação da peçonha – Obtenção e Preparação .....	32
3.3. Separação dos componentes.....	33
3.4. Identificação da massa molecular e sequenciamento .....	33
3.5. Linhagens Bacterianas.....	34
3.6. Reconstituição das cepas para os ensaios .....	35
3.7. Preparação do inóculo .....	36
3.8. Ensaio de Disco-difusão.....	36
3.9. Ensaio de Microdiluição em Caldo .....	36
3.9.1. Diluição dos antimicrobianos para o controle positivo de inibição .....	37
3.9.2. Diluição do peptídeo .....	37
3.10. Controle negativo de inibição.....	37
3.11. Controle negativo de crescimento (branco) .....	37
3.12. Leitura do resultado .....	38
3.13. Cálculo da porcentagem de inibição do crescimento bacteriano .....	38
4. Resultados .....	39
4.1. Perfil cromatográfico .....	39
4.2. Espectrometria de massa.....	41
4.3. Síntese do Peptídeo.....	44
4.4. Atividade antimicrobiana .....	44
5. Discussão.....	56
6. Conclusão .....	67

7. Referências .....	68
----------------------	----

## 1. Introdução

O surgimento de bactérias resistentes pode ser observado desde a introdução na prática clínica, dos primeiros agentes antimicrobianos. Desde então, a rápida disseminação destes patógenos multirresistentes tem representado uma séria ameaça, considerando-se fatores como as altas taxas de mortalidade, a restrição de tratamentos e a alta prevalência de bactérias resistentes aos antimicrobianos no ambiente hospitalar (Walsh *et al*, 2005).

O primeiro antibiótico, a penicilina, foi descoberto por Alexander Fleming, em 1929, em um hospital londrino. Anos mais tarde, durante a Segunda Guerra Mundial, a penicilina foi amplamente utilizada contra estafilococos e estreptococos, grandes causadores de pneumonias, infecções aéreas superiores, septicemias. A resistência à nova droga foi descrita quase que imediatamente, bactérias produtoras de penicilinase (pertencentes ao grupo das betalactamases) sobreviviam à terapêutica clínica, sendo suscetíveis apenas a altas doses cujas concentrações eram inatingíveis sem efeitos de toxicidade (Russel e Chopra, 1990; Hawkey, 1988).

Inicialmente, o fenômeno da resistência bacteriana não parecia ser um problema tão grande. Foi temporariamente resolvido com a introdução de novos agentes antibacterianos, tais como os aminoglicosídeos, macrolídeos, glicopeptídeos e ainda, modificações estruturais nos compostos já existentes, que refletiam em alteração de sua atividade e espectro antimicrobiano. Atualmente, se conhecem micro-organismos multirresistentes, não sensíveis a quaisquer dos antibióticos disponíveis clinicamente, levando rapidamente à morte pacientes hospitalizados. Esses casos são cada vez mais frequentes, inclusive no Brasil (Gold, 1996; Saderet *et al*, 1998).

A Portaria 2.616/98 do Ministério da Saúde traz diretrizes e normas para o controle das infecções hospitalares. Em seu anexo II, são conceituados critérios para o diagnóstico das infecções, classificando-as em comunitárias ou hospitalares. Infecção hospitalar “É qualquer infecção adquirida após a internação do paciente e que se manifesta durante a internação ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares” (Brasil, 1998).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010), micro-organismos multirresistentes são resistentes a diferentes classes de antimicrobianos testados em exames microbiológicos. Já os pan-resistentes, são aqueles com resistência comprovada *in vitro* a todos os antimicrobianos testados em exame microbiológico. São considerados, pela comunidade científica internacional, patógenos multirresistentes causadores de infecções/colonizações relacionadas à assistência em saúde: *Enterococcus spp* resistente aos glicopeptídeos, *Staphylococcus spp*. resistente ou com sensibilidade intermediária a vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, e Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ertapenem, meropenem ou imipenem), destacando-se entre estas a *Klebsiella pneumoniae* e as espécies de *Enterobacterspp* (Brasil,2010; Boucher *et al*,2009).

A associação dos micro-organismos multiresistentes à infecção hospitalar é motivo de grandes preocupações para um futuro próximo, se medidas urgentes não forem tomadas. O uso inadequado dos recursos diagnósticos e terapêuticos proporciona aumento significativo do risco de infecção. Diante desta situação, a infecção tem sido apontada como um dos mais importantes riscos aos pacientes hospitalizados (Andrade e Angerami, 1999).

As infecções hospitalares influenciam drasticamente o período de hospitalização. Em especial, os índices de morbimortalidade, que repercutem de maneira significativa nos custos financeiros, considerando o prolongamento da internação, o consumo de antibióticos, os gastos com isolamento e os exames laboratoriais (Pittet,2005).

Os pacientes críticos hospitalizados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) são mais vulneráveis à infecção hospitalar em comparação com as demais unidades. Estes pacientes têm de cinco a dez vezes mais probabilidade de contrair uma infecção hospitalar e que pode representar cerca de 20% do total de infecções de um hospital. Pacientes da UTI são comumente agredidos por múltiplos procedimentos invasivos e têm os mecanismos de defesa imunológicos comprometidos, o que exige o uso de antimicrobianos, especialmente, os de última geração. No geral, estes são fatores determinantes na ocorrência de infecções, especialmente por cepas multirresistentes. O fenômeno da multirresistência se

constitui em ameaça à sociedade, sendo importante ressaltar que a indústria farmacêutica se encontra sem resposta terapêutica significativa (Vincent, 2003; Pilonetto *et al*, 2004; Martinset *et al*, 2004; Cepeda *et al*, 2005).

Os antibióticos salvam milhões de vidas e diminuem o sofrimento dos pacientes de todas as idades há mais de 60 anos. Esses compostos têm sido responsáveis pelo grande aumento da expectativa de vida nos Estados Unidos e ao redor do mundo desde o século 20. Entretanto, é inevitável que, ao longo do tempo, as bactérias desenvolvam resistência aos antibióticos já existentes (Fridkin e Gaynes, 1999; Andrade *et al*, 2006).

Apesar da necessidade urgente de novos medicamentos para tratar infecções resistentes, não há muitos projetos do setor farmacêutico para pesquisa de novos antimicrobianos. Grandes empresas farmacêuticas estão perdendo o interesse em pesquisar antibióticos apesar de aumentarem os seus orçamentos. É preocupante a escassez de recursos que estão sendo investidos na descoberta de novas drogas antimicrobianas. Esta tendência começou há mais de 10 anos. Em 1990, metade das grandes empresas farmacêuticas nos Estados Unidos e no Japão suspenderam ou diminuíram significativamente seus esforços de descoberta de antibióticos (IDSA, 2004).

A resistência aos antibióticos disponíveis atualmente é um problema sério em todas as partes do mundo, inclusive na América Latina. Assim, os desafios regulatórios, financeiros e científicos que impedem o desenvolvimento de medicamentos antibacterianos são um problema global (Brower e Chalk, 2003).

Segundo a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) este problema pode ser resolvido reunindo setores político e científico global, de propriedade intelectual e econômica, além de políticos, médicos e líderes filantrópicos para desenvolverem incentivos criativos que estimulem a investigação de novos antibacterianos. O objetivo da IDSA é a criação de uma droga antibacteriana global sustentável e uma empresa com o poder a curto prazo, de desenvolver 10 novos antibióticos, seguros e eficazes para 2020. Para atingir este objetivo, IDSA lançou a campanha "10x'20" A iniciativa. Especificamente, a IDSA apoia o desenvolvimento de 10 novos medicamentos antibacterianos sistêmicos através da descoberta de novas classes de medicamentos, bem como explorar possíveis novas drogas a partir de classes

existentes de antibióticos e ainda possibilitar o avanço no desenvolvimento de melhores testes diagnósticos específicos para infecções multirresistentes(Gilbert *et al*,2010).

## 1.1. Patógenos “ESKAPE”

Há muitos relatos recentes do aumento das infecções causadas por um grupode patógenos representados pelo acrônimo ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter sp.* O termo ESKAPE faz referência ambígua, representando tanto a dificuldade de eliminar as infecções por estes patógenos devido aos diversos mecanismos de escape que apresentam, quanto à intenção de descoberta de novas drogas antimicrobianas, capazes de eliminar as infecções por eles causadas(Boucheret *al*,2009).

Apesar de não compartilharem os mesmos mecanismos de indução de resistência, todos tem em comum uma prevalência que vem crescendo progressivamente em virtude da pressão seletiva exercida pelas políticas (ou ausência delas) de uso de antimicrobianos, principalmente nas UTIs (Cooper e Shlaes, 2011).

### 1.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudo*, significa falso, *mona*, uma unidade e *aeruginosa*,cheio de ferrugem, ou verde. A espécie *Pseudomonas aeruginosa* pertence à família Pseudomonadaceae. Em sua maioria, são micro-organismos de vida livre, habitam o solo, a água, matéria orgânica em decomposição, podendo infectar diversas espécies de animais e plantas. São encontradas em todo ambiente hospitalar, distribuídas em vários reservatórios, como alimentos, pias, banheiros, equipamentos de terapia respiratória e diálise, até mesmo em soluções desinfetantes e água destilada. Possuem fácil adaptação às condições ambientais de temperatura e umidade, mínimas necessidades nutricionais, capacidade de superar os

mecanismos de defesa do hospedeiro, constituindo a principal característica dessa bactéria, o desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Devido a essas características, esta espécie é de grande importância clínica (Pollack, 2000; Cedricet *al*, 2005; Warrelet *al*, 2012).

Caracteriza-se como bastonete gram-negativo reto ou ligeiramente curvo, medindo 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de largura e 1,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, não esporulado, aeróbio estrito, exceto na presença de nitrato, circunstância em que cresce em condições anaeróbias. Não é capaz de utilizar a glicose por via fermentativa, mas sim por oxidação. Da mesma forma, é capaz de oxidar a xilose, sendo incapaz de utilizar maltose por qualquer via. Pode ser observada como células isoladas, aos pares ou em cadeias curtas, sendo a maioria móvel, em grau variado, na dependência do número e das posições dos flagelos polares monotríqueos. As reações positivas para catalase, oxidase, indofenol, arginina-hidrolase, presença de citocromo oxidase, são usadas para diferenciá-la do grupo das enterobactérias (Konemanet *al*, 2008).

Os fatores de virulência para esta bactéria incluem componentes estruturais, toxinas e enzimas. Os componentes estruturais melhor estudados são o alginato ou cápsula de polissacarídeo, pili, lipopolissacarídeo e a piocianina (Cedricet *al*, 2005). O alginato é um polissacarídeo extracelular, que confere a forma mucóide das colônias, permitindo maior aderência às superfícies celulares epiteliais. Protege o micro-organismo da fagocitose e da ação de antibióticos. Pode agir como uma barreira para moléculas hidrofóbicas tóxicas, tais como detergentes, e promover a aderência a outras bactérias ou aos tecidos do hospedeiro. Além disso, o alginato suprime a atividade dos neutrófilos e linfócitos e produz um biofilme de polissacarídeo, estabelecendo uma comunidade de bactérias, protegendo da ação dos antimicrobianos como os aminoglicosídeos e das defesas do hospedeiro. Sua produção está sob uma complexa regulação, podendo cepas mucóides reverter o fenótipo não-mucóide sem causa conhecida (Ojeniyiet *al*, 1985). Os pili e as adesinas não-fímbricas, são filamentos retos, mais finos e menores que o flagelo, estendem-se a partir da superfície celular e são importantes na adesão das células epiteliais do hospedeiro. Há produção de neuraminidase, que remove os resíduos do ácido siálico a partir do pili receptor, aumentando a aderência da bactéria às células epiteliais (Konemanet *al*, 2008).

Em pacientes com fibrose cística, distúrbio hereditário que se caracteriza por insuficiência pancreática, concentrações anormais de eletrólitos no suor e pela produção de secreções brônquicas bastante viscosas, há uma intensa estase nos pulmões, o que dificulta o movimento mucociliar. Isso propicia infecções bacterianas crônicas recorrentes, causadas principalmente por *P. aeruginosa*, bronquiectasias e progressivo declínio da função pulmonar (Gilligan,1991).

Outro importante fator de virulência da *P. aeruginosa* é a endotoxina, que é um tipo de lipopolissacarídeo considerado o principal marcador sorológico da membrana externa dos micro-organismos gram negativos. Esta bactéria é capaz de liberar toxinas no seu meio circundante durante a sua multiplicação e, mais ainda, quando morrem, entre as toxinas pode-se citar, a piocianina, as exotoxinas, leucocidina, elastases, proteases, fosfolipases e o ramnolípídeo (Volket *al*,1991).

A piocianina, um pigmento azul, catalisador da produção de formas tóxicas do oxigênio, como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, estimula a liberação de interleucina 8, acarretando um aumento da atração de neutrófilos e levando ao estímulo da resposta inflamatória. Além da piocianina, a *P. aeruginosa* produz também a exotoxina A, um dos mais importantes fatores de virulência produzidos pelas cepas patogênicas, que impede a síntese protéica, produz dano tissular e é imunossupressora. As exotoxinas S e T são extracelulares e atuam na síntese protéica e na imunossupressão. A citotoxina leucocidina produz dano microvascular pulmonar, interfere na função leucocitária, é citotóxico para membranas eucarióticas. Por sua vez, as elastases atuam através de enzimas para degradar tecidos que contenham elastina, como vasos sanguíneos, pele e tecido pulmonar, colágeno, imunoglobulinas e fatores do complemento. A protease alcalina contribui para destruição tecidual, inativação do interferon e fator de necrose tumoral alfa. A fosfolipase C é uma hemolisina termolábil que quebra lipídeos e lecitina, contribuindo para destruição dos tecidos, estimulando a resposta inflamatória. O ramnolípídeo é uma hemolisina estável que inibe a atividade ciliar pulmonar (Cedricet *al*, 2005; Bombergeret *al*,2009).

A infecção por este micro-organismo é considerado oportunista, raramente se torna causa de infecções comunitárias, assumindo um importante papel como agente etiológico de infecções hospitalares, contribuindo para o aumento da taxa de

morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados, além de aumentar o tempo de internação desses pacientes e, conseqüentemente, o custo do tratamento. O avanço tecnológico na área de procedimentos invasivos terapêuticos e diagnósticos, o manuseio da imunossupressão para transplantes e controle de doenças auto-imunes, levaram a um grande número de pacientes em estado grave e imunologicamente comprometidos nos hospitais. Longos períodos de hospitalização, doenças de base (como diabetes, neoplasias), queimaduras, procedimentos cirúrgicos, utilização de cateteres, uso prévio de antimicrobianos e o uso de antimicrobianos de amplo espectro, além de falhas relativas ao controle de infecção hospitalar causaram a emergência dos bacilos gram negativos nas infecções hospitalares mundiais, uma vez que a velocidade de desenvolvimento e a introdução de novas drogas no mercado têm sido superadas pelo desenvolvimento de mecanismos de resistência bacterianos. As taxas de infecção por *P. aeruginosa* resistentes, sensíveis somente a colistina estão aumentando e o surgimento de uma cepa sem opções terapêuticas conhecidas é iminente (Aloushet *al*, 2006; Mesaros,2007; Hirschet *al*,2010; Housmanet *al*,2012).

A *Pseudomonas aeruginosa* é intrinsecamente resistente a uma variedade de agentes antimicrobianos e pode desenvolver resistência durante a quimioterapia anti-pseudomonas, ambos comprometendo o tratamento de infecções causadas por este organismo. Resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, em particular, é cada vez mais comum nessa bactéria, com muitos relatos de isolados pan-resistentes tratáveis com um único agente, a colistina. Resistência adquirida neste organismo é multifatorial e atribuível às mutações cromossômicas e aquisição de genes de resistência através de transferência horizontal destes genes (Shuet *al*, 2012). Mutações que resultam em alta resistência incluem sistemas de efluxo que promovem a expulsão antimicrobiana da célula bacteriana, desrepressão da AMPC (betalactamases induzíveis do tipo amp C), alterações que ampliam a especificidade da enzima AmpC - substrato , alterações da permeabilidade da membrana externa para limitar a entrada antimicrobiana e alterações nos alvos dos antimicrobianos(Sampathkumar,2010).

Mecanismos adquiridos que contribuem para a resistência em *P. aeruginosa* incluem produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e as carbapenemases que hidrolisam a maioria dos beta-lactâmicos, inclusive os

carbapenêmicos; enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, como metilases 16S rRNA que oferecem alto nível de resistência a vários aminoglicosídeo. A propensão do organismo crescer *in vivo* como biofilmes tolerantes a antimicrobianos favorecendo a presença de cepas hiper-mutantes também pode comprometer a terapia anti-pseudomonas (Nikaido,1989; Mingeot *et al*,1999; Bush,2001; Hancock *et al*,2002; Livermore,2002; Polotto *et al*,2012).

#### 1.1.2. *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido(ESBL) e carbapenemase do tipo (KPC)

As Enterobactérias são bactérias gram-negativas, podendo ser encontradas em água, solo e plantas, bem como no trato gastrointestinal dos seres humanos e animais, podendo estar presentes também no trato respiratório e geniturinário. Se diferem das gram positivas na organização de suas estruturas que são encontradas externamente à membrana plasmática. Nas bactérias gram positivas existe apenas uma estrutura externa à membrana plasmática, que é espessa e apresenta uma larga camada de peptidoglicano. Já nas gram-negativas as estruturas que envolvem a membrana plasmática são a membrana externa e a parede celular que, juntas, formam o envelope celular, que apresenta uma fina camada de peptidoglicano (Costerton *et al*,1974; Koneman *et al*, 2008).

Dentro da família das enterobactérias, encontra-se o gênero *Klebsiella* que tem merecido uma atenção especial nos últimos tempos, pois estão entre os patógenos mais freqüentemente isolados na microbiologia clínica e, esse número vem aumentando tanto nos pacientes hospitalares quanto na comunidade. Além disso, esse micro-organismo apresenta uma espécie, a *Klebsiella pneumoniae*, que está sendo muito estudada nessas últimas décadas por apresentar uma séria resistência a alguns antibióticos. A prevalência de infecção causada por cepas multiresistentes de *K.pneumoniae* tem aumentado vertiginosamente (Tortora *et al*, 2000; Gupta *et al*, 2011). A presença de *Klebsiella* deve ser presumida quando se tem presença de colônias grandes e mucóides, de coloração avermelhada, quando plaqueada em meio sólido McConkey (Koneman *et al*,2008).

Antes do advento da quimioterapia, dos antibióticos e de medidas imunossupressoras, as doenças infecciosas relacionadas a essa espécie bacteriana, estavam relativamente ligadas apenas a síndromes diarréicas acompanhadas de febre e, nos casos mais graves, poderiam apresentar uma septicemia. Posteriormente passou a ser conhecida também como a agente causadora da pneumonia, na qual essa bactéria é responsável por uma pequena porcentagem de casos dessa patologia (Calfee, 2008). Sabe-se que pacientes imunocomprometidos ou debilitados, com câncer, são altamente susceptíveis a infecções hospitalares, após colonização por cepas ambientais ou contaminação a partir de procedimentos invasivos, tais como: cateterismo, broncoscopias ou até biópsias cirúrgicas com os quais membranas mucosas são traumatizadas (Lautenbach *et al*, 2001; Koneman *et al*, 2008). A maior prevalência de infecções por *K.pneumoniae* durante os anos 1990, reflete um aumento das infecções em paciente debilitados com diabetes, naqueles que sugerem um quadro de etilismo, imunossuprimidos, além de uma maior resistência aos antibióticos, pois 90% dos pacientes não são tratados adequadamente. O amplo e indiscriminado uso de antimicrobianos tem criado bastonetes gram negativos altamente resistentes (Silva, 1999). Na última década houve um aumento significativo das infecções por *K.pneumoniae*, principalmente, as portadoras de importantes genes de resistência transportados por elementos genéticos móveis (Gupta *et al*, 2011; Nordmann *et al*, 2011).

É de grande preocupação o recente aparecimento de cepas de *Klebsiella* que possuem plasmídeos mediadores de resistência a um amplo espectro de drogas  $\beta$ -lactâmicas, incluindo as cefalosporinas de 3<sup>o</sup> geração (Coque *et al*, 2008). Essa forma de resistência dá-se pela produção das enzimas  $\beta$ -lactamases, que são capazes de catalisar a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico de penicilinas e cefalosporinas, dentre outros, impossibilitando dessa forma suas atividades antimicrobianas. Esse é o principal mecanismo de resistência das bactérias gram-negativas aos  $\beta$ -lactâmicos, sendo que o grau de resistência irá depender da quantidade de enzima produzida, de sua habilidade em hidrolisar o antimicrobiano, bem como da velocidade com que o antibiótico penetra pela membrana externa da bactéria (Sader, 2000).

As  $\beta$ -lactamases são produzidas por inúmeras espécies bacterianas, porém com diversidades estruturais e localizações diferentes. Nas bactérias gram positivas, as  $\beta$ -lactamases são secretadas para o meio extra-celular, dessa forma irão apresentar uma atividade menor do que as que são produzidas em bactérias gram-negativas. Nessas bactérias, as  $\beta$ -lactamases encontram-se estrategicamente situadas no espaço periplasmático, espaço situado entre a parede celular e a membrana externa, podendo alcançar maiores concentrações e agirem de modo mais eficaz sobre os  $\beta$ -lactâmicos. Podem ser classificadas em três grandes grupos de importância clínica (Koneman *et al*, 2008):

- $\beta$ -lactamases cromossômicas induzíveis
- $\beta$ -lactamases plasmidiais de espectro estendido
- $\beta$ -lactamases capazes de degradar carbapenens

A  $\beta$ -lactamase de espectro estendido, também conhecida como ESBL é a de maior significado para o estudo da resistência em *Klebsiellas*. Essas podem ser transferidas horizontalmente entre bactérias de uma mesma espécie ou entre espécies diferentes via plasmídeos e, por esse motivo, representam um sério problema clínico, pois a disseminação ocorre de forma mais facilitada, conseguindo degradar praticamente todos os  $\beta$ -lactâmicos com exceção dos carbapenens, pois esse é um antibiótico que apresenta um anel estável à hidrólise da  $\beta$ -lactamase (Bush, 1995; Bush, 2010).

*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase, ou KPC, é uma enzima que hidrolisa os antibióticos carbapenêmicos, como imipenem e meropenem (Rasmussen e Hoiby, 2007), além de ser capaz de atuar também na inativação de penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (Dienstsmann *et al*, 2010). A KPC é uma carbapenemase que utiliza serina em seu sítio ativo, sendo inibida (*in vitro*) somente pela ação do ácido clavulânico e pelo tazobactam (Bush, 2010). Pelo sistema definido por Bush, Jacoby e Medeiros (1995), a KPC pertence ao grupo 2 que abrange as serina carbapenemases, cefalosporinases, penicilinas e ESBLs ( $\beta$ -lactamases de Espectro Estendido), que são inibidas pelos inibidores de  $\beta$ -lactamase normalmente comercializados (Bush *et al*, 1995). O grupo 2 apresenta uma série de subgrupos (a-f), baseados no espectro de atividade enzimática, sendo

a KPC pertencente ao subgrupo 2f (Rasmussen e Hoiby, 2007; Bush, 1995). Na classificação de Ambler (1980), que divide as carbapenemases em grupos (A a D) baseados em sua sequência de aminoácidos, a KPC se encaixa no grupo A (Ambler, 1980).

Os carbapenens são os substratos dessas enzimas que são codificadas por plasmídeos (gene  $bla_{KPC}$ ) (Nordmann *et al*, 2009). A KPC foi classificada por meio de estudos moleculares, e após foi documentada em diferentes tipos de bactérias (KPC 1-4) (Monteiro *et al*, 2008). Esses tipos diferem entre si por mutações de ponto, ou seja, variantes das sequências de aminoácidos, tendo como referência a sequência presente na KPC-1 (Queenan e Bush, 2007). A KPC-1 foi isolada primeiramente em 2001 de uma amostra de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenem. A KPC-2 foi isolada posteriormente, em 2003 e 2004, em cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica* e *Enterobacter* sp. E a KPC-3 foi isolada entre 2004 e 2006 em amostras *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* (Cai *et al*, 2008).

Para verificação fenotípica de resistência mediada por KPC, o método mais utilizado (que apresenta maior especificidade e sensibilidade) é o Teste de Hodge Modificado (Stuart e Hall, 2010). No Brasil, o teste utilizado para pesquisa de KPC, era o Teste de Hodge Modificado, padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), em sua maioria, utilizando-se discos de ertapenem. Esse procedimento era realizado até outubro de 2010, quando a ANVISA publicou uma nota técnica padronizando a utilização de discos de imipenem e meropenem, devendo esses serem testados compulsoriamente. Isso se deve ao fato de ter sido verificado que um número elevado de amostras de *Klebsiella pneumoniae*, por meio de produção de cefotaximases, apresentava perda de porinas, sendo dessa forma falsamente detectadas como KPC. Dessa forma, a ANVISA padronizou novos critérios para pesquisas de carbapenemases em geral, sem especificar nenhum teste, somente frisando a importância de testar imipenem e meropenem, critérios interpretativos específicos e formas de liberar resultados (se presente, liberar como 'enterobactéria produtora de carbapenemase', sem especificar o tipo) (BRASIL, 2010).

### 1.1.3. *Acinetobacter spp*

*Acinetobacter spp.* é um cocobacilo gram negativo da família Moraxellaceae. Entre sua variedade de espécies, a que tem se mostrado de maior importância clínica é o *Acinetobacter baumannii* (Zarrilliet al, 2009). É um patógeno que emergiu bastante, sendo um dos principais causadores de infecções nosocomiais, bacteremia, infecções do trato urinário e pneumonia, especialmente em UTIs. Hoje em dia, a maioria dos casos de infecções por esse patógeno, é adquirida em hospitais, principalmente devido ao longo tempo de internação (Sengstocket al, 2010). É uma bactéria que pode ser isolada também de ambiente, tendo sido encontrada em reservatórios de água, como chuveiros (Guardabassiet al, 1999). Sua habilidade de sobreviver tanto no hospedeiro quanto no meio ambiente se deve ao fato de sua capacidade de utilizar recursos presentes nesses meios, como a obtenção de ferro (Gordon e Wareham, 2009). Essa forma de sobrevivência intriga tanto quanto sua capacidade de formar biofilmes, contribuindo para sua colonização e aderência, assim como no desenvolvimento de mecanismos de resistência (Leeet al, 2008). Seu potencial de liberação de lipopolissacarídeos (LPS, importante molécula para desenvolvimento de sepse por bactérias gram-negativas) também pode ser considerado um fator de virulência importante, causando liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos (Erridget al, 2007).

*Acinetobacter baumannii* possui diversos tipos de mecanismos de resistência, nos últimos tempos apresentando resistência a todas as classes de antibióticos (Dijkshooret al, 2007). Seus principais mecanismos de resistência a  $\beta$ -lactâmicos se devem a produção de oxacilinas de classe D (classe de  $\beta$ -lactamase), enzimas que pode ser codificadas por plasmídeos ou cromossomos e são capazes de hidrolisar penicilinas e carbapenêmicos (Meriket al, 2008). As oxacilinas possuem fraca atividade contra cefalosporinas de largo espectro. O mecanismo de resistência responsável pela hidrólise de cefalosporinas é a enzima cromossomal AmpC cefalosporinase (Gordon e Wareham, 2009). Estudos mostram ainda cepas que apresentaram mecanismos de resistência de metalo- $\beta$ -lactamases dos tipos VIM, IMP e SIM (Gordon e Wareham, 2009; Zarrilli et al, 2009). Dessa forma, a melhor opção de tratamento visada pelos clínicos são as polimixinas que, apesar de seu

efeito nefrotóxico, ainda é considerada a melhor opção terapêutica (Hawley *et al*, 2008). E dessa forma, pelo uso indiscriminado e considerando também o tempo de internação dos pacientes, já foram relatados casos de cepas de *A. baumannii* que sofreram mutações em genes, modificando cadeias de lipídeos específicos, conferindo resistência a polimixina B e colistina (polimixina E), havendo necessidade de combinação terapêutica para tratamento do paciente (Moffatt *et al*, 2010).

#### 1.1.4. *Enterococcus faecalis*

Um dos principais patógenos causadores de infecções nosocomiais é o *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE), sendo encontrado de modo significativo em infecções urinárias, infecções de sítio cirúrgico e bacteremias (Furtado *et al*, 2005 *apud* Gold, 2001).

De acordo com o manual de Investigação e Controle de Bactérias Multirresistentes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os *Enterococcus* são “*de natureza saprófita e habitam o solo, os alimentos, o trato gastrointestinal, o trato geniturinário, crescem em soluções salinas e em detergentes. Quanto à coloração do gram, são gram positivos aeróbicos e facultativo anaeróbico*”. São representados por dezesseis espécies, sendo as duas espécies principais que causam a maioria das infecções o *E. faecalis* e *E. faecium* (Furtado *et al*, 2005).

A resistência intrínseca a diversos antimicrobianos é uma característica peculiar do gênero *Enterococcus*, sendo observada progressiva aquisição de resistência a antimicrobianos utilizados nos tratamentos de infecções enterocócicas (Furtado *et al*, 2005 *apud* Elopoulos, 1998). Tem-se observado acelerado aumento na incidência de cepas resistentes aos antimicrobianos de uso contínuo. O desenvolvimento de resistência à vancomicina tem sido descrito a partir do final da década de 80 e desde então, foi observado um aumento das infecções e colonizações por VRE (Saraiva *et al*, 1997).

A primeira identificação de *Enterococcus* resistente a vancomicina foi na Europa em 1987, sendo um marco inicial para um rápido aumento no número de

infecções hospitalares relatado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças. (Titze-De-Almeida *et al*, 2004).

Em 1996, o primeiro VRE foi identificado no Brasil, em um hospital de Curitiba. A partir deste fato, em vários hospitais brasileiros ocorreram notificações de isolamento de VRE, sendo que um estudo realizado pela Escola Paulista de Medicina demonstrou significativo progresso da resistência a vancomicina por esse gênero de bactéria, entre 2000 e 2002. E para concluir e demonstrar o rápido aumento deste patógeno em casos clínicos foram relatados 23 casos de infecção de corrente sanguínea por VRE em UTIs de adultos e unidades coronarianas em 2005, segundo dados do Sistema de Vigilância das Infecções Hospitalares do Estado de São Paulo (Vranjac, 2007).

Em espécies de *Enterococcus*, a resistência adquirida a antimicrobianos do tipo glicopeptídios (vancomicina), corresponde basicamente a cinco fenótipos diferentes, denominados como VanA e VanB (sendo estes os mais comuns e conseqüentemente com maior importância clínica), VanD, VanE e VanG (Shepard e Gilmore, 2002).

Essa resistência aos glicopeptídios ocorre devido à síntese de distintos precursores de peptidoglicano que são incorporados na parede celular e apresentam certa redução da afinidade de ligação pela vancomicina, impedindo sua ação no bloqueio da síntese da parede celular (Furtado *et al*, 2005).

Os principais fatores de risco para um paciente adquirir uma infecção por *Enterococcus* multirresistentes são: ter uso prévio de antimicrobianos de amplo espectro; ter longa permanência hospitalar; internação em UTIs ou unidades de queimados; ter infecção de sítio cirúrgico; leito próximo ao de um paciente colonizado ou infectado por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA); insuficiência renal e cateterismo vesical e cateterismo vascular (ANVISA, 2007).

De modo geral, as infecções por VRE podem ser causadas pela própria microbiota endógena do paciente, por contato direto entre pacientes, ou transmissão cruzada com mãos de profissionais de saúde ou ambiente contaminado (Moura, 2006), tais como; equipamentos/artigos médicos (termômetros, estetoscópios, aparelhos de pressão e eletrodos de ECG) e superfícies (mesa, maçaneta, telefone, bandeja de medicação, grade de cama), entre outros (Vranjc, 2007).

De acordo com o DeLise (2003), os VREs possuem uma significativa sobrevivência no ambiente, tendo vida de uma semana a dois meses em balcões, alguns dias a três meses em tecidos diversos e plástico, e mais de sete dias em tecidos de cadeira. Em relação a culturas de quartos, o DMIP constatou a prevalência de 46% de pacientes VRE com diarreia e 15% de pacientes VRE sem diarreia, sendo que quartos de pacientes colonizados relatam prevalência de 60 a 70% em três ou quatro sítios.

### 1.1.5. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é um coco gram-positivo da Família Micrococcaceae, apresentando-se normalmente isolados, em forma de “cachos de uva”. São imóveis, não-esporulados, e apresentam reação positiva à catalase. São coagulase positivos, fermentando manitol e algumas cepas são capazes de fazer hemólise em ágar sangue (Trabulsiet *al*, 2002; Warrellet *al*, 2012). Em sua formação, desenvolvem uma cápsula de proteção, formada por uma camada de ácido hialurônico, mais externa, que dificulta a fagocitose, agindo como principal fator de virulência dessa bactéria (Konemanet *al*, 2008). É um micro-organismo que se dissemina facilmente e apresenta vários mecanismos de ação e patogenicidade, pois pode sobreviver em ambientes pouco úmidos e podem formar biofilmes (camadas múltiplas de bactérias, associadas ou não a outros micro-organismos) em diferentes tipos de superfícies, além disso, a produção de muitas toxinas e elementos reguladores podem aumentar a virulência em estafilococos (Cordeiro, 2004; Warrellet *al*, 2012).

*Staphylococcus aureus* é frequentemente isolado de feridas pós-cirúrgicas, podendo causar infecções sistêmicas, sendo o micro-organismo que apresenta maior taxa de morbidade e mortalidade em infecções hospitalares hoje em dia (Vonberget *al*, 2006). Quando causa bacteremia, pode ocasionar endocardite, osteomielite, piocardite e meningite. As infecções e síndromes clínicas por *Staphylococcus aureus* podem ser divididas em três grupos:

(1) doença devido à liberação de toxinas, levando à doença em locais remotos a partir de infecção primária, incluindo (a) síndrome da pele escaldada

estafilocócica, síndrome de liberação de toxinas epidermolíticas que conduz a formação de bolhas e descamação, (b) doença de origem alimentar, devido à presença de uma toxina estável ao calor, que produz vômitos e diarreia súbita, (c) síndrome do choque tóxico, toxinas que são superantígenos causando disfunção de múltiplos órgãos, podendo ser associada ao período menstrual (por exemplo, associado ao uso de tampão interno) ou não menstrual.

(2) Doença devido a destruição de tecidos local e formação de abscessos, incluindo (a) o impetigo, foliculite e celulite, (b) furúnculos e carbúnculos, (c) de mastite, (d) piomiosite; (e) bursite séptica, (f) artrite séptica; (g) osteomielite; (h) abscesso epidural; (i) pneumonia; (j) infecção urinária.

(3) infecção hematogênica incluindo bacteremia e endocardite (Vonberg *et al*, 2006; Warrellet *et al*, 2012).

*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é um causador importante de infecções associadas a cuidados de saúde e infecções na comunidade, por poderem estar presentes em microbiota nasal, intestinal, epitelial, entre outros, mas, entre eles, as fossas nasais são consideradas o local de maior reprodução e colonização (Guzman-Blanco *et al*, 2009; Liu *et al*, 2011). O MRSA foi descrito pela primeira vez na Europa, em 1961, espalhando-se globalmente nas décadas seguintes (Fortaleza *et al*, 2009; Rodriguez-Noriega e Seas, 2010; Köck, 2010). O mecanismo de resistência à meticilina desenvolvido por essa bactéria está relacionado com a produção das proteínas de ligação com a penicilina, as PBPs. O *S. aureus* produz quatro tipos de PBPs: de PBP1 a PBP4. As cepas MRSA expressam uma nova PBP, a PBP2a ou 2', adquirida de outras espécies de estafilococos e codificada pelo gene MEC A que codifica a mudança do sítio de ligação da meticilina à bactéria. A PBP2a mostra baixa afinidade, não apenas à meticilina e à oxacilina, mas praticamente a todos os antibióticos beta-lactâmicos. (Tomasz, *et al* 1989). Algumas cepas podem apresentar-se resistentes a todos os tipos de  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenems), assim como de outras classes de antimicrobianos (quinolonas, clindamicina, entre outros). O alvo de atuação dos  $\beta$ -lactâmicos é a parede celular (sua síntese mais especificamente), impedindo a formação da camada de peptidoglicano, causando a morte da bactéria (Menegotto e Picoli, 2007).

Na comunidade, não é raro encontrar essa bactéria na pele e fossas nasais, mesmo em pessoas saudáveis que tiveram ou não contato com serviços de saúde. Essa bactéria, referida como Community-associated MRSA ou CA-MRSA, está mais relacionada com feridas superficiais (Johnston *et al*, 2007). Existe ainda a Health-associated MRSA ou HA-MRSA, que ocorre em ambiente hospitalar, principalmente em pacientes imunocomprometidos e histórico de hospitalização, podendo causar infecções muito graves, como septicemia e pneumonia. A maioria das infecções causadas por MRSA são relacionadas à ambiente hospitalar, sendo fatores de risco para a mortalidade associada a HA-MRSA: a malignidade hematológica, transplante de células hematopoiéticas, infecção secundária a infecção de corrente sanguínea, MRSA com a concentração inibitória mínima (MIC)  $\geq 2,0$  ug / mL para vancomicina, ventilação mecânica, e interrupção tardia de terapia empírica com falha terapêutica (Weber, 2008; Mahajan *et al*, 2012).

Os primeiros casos documentados de infecções por CA-MRSA ocorreram entre aborígenes australianos e nativos americanos no Canadá, no início da década de 90. Posteriormente, estas infecções se propagaram pelo mundo, incluindo diversos surtos, tanto nos Estados Unidos como em diversos outros países (Lopes, 2005). Foi descrita uma alarmante epidemia causada por cepas CA-MRSA, causando infecções graves que resultaram em fascíte necrosante e até mesmo a morte em adultos saudáveis fora dos ambientes de saúde, assim como toxinfecção alimentar (Chambers, 2005; Miller *et al*, 2005; Robert *et al*, 2006).

As CA-MRSA possuem fatores de virulência únicos, como a exotoxina formadora de poros, chamada Panton-Valentine Leucocidina (PVL), que está relacionada com infecções severas de pele, pneumonia necrotizante e osteomielite (McAdam *et al*, 2008; Hermost *et al*, 2010). Atualmente, houve um aumento na incidência de infecções de pele e tecidos moles causadas por esta variante (Quall *et al*, 2012). Além disso, as cepas de CA-MRSA podem apresentar resistência a diferentes classes de antimicrobianos, além dos betalactâmicos, como clindamicina, eritromicina e mupirocina, sendo este último indicado na descolonização nasal de portadores desta bactéria (Wanget *et al*, 2012).

## 1.2. Peptídeos Antimicrobianos (PAM)

Peptídeos antimicrobianos (PAM) são convencionalmente definidos como substâncias antimicrobianas polipeptídicas, codificadas por genes e sintetizados por ribossomos, com menos de 100 resíduos de aminoácidos. Esta definição os distingue da maioria (mas não todos) dos antibióticos peptídicos de bactérias e fungos, os quais são sintetizados por vias metabólicas especializadas e muitas vezes incorporam aminoácidos exóticos (Ganz, 2003).

Os PAM, presentes na maioria dos seres vivos, em geral, representam moléculas do sistema imune inato, que são capazes de exercer uma atividade antimicrobiana potente contra diferentes e numerosos micro-organismos, além da grande vantagem de não apresentar nenhuma toxicidade às células animais, ou uma toxicidade extremamente baixa. Pesquisas sobre a imunidade inata levaram à obtenção de muitas informações que oferecem perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana (Skarnes e Watson, 1957; Boman, 1991; Boman, 1995; Boman, 2003; Bullett *et al*, 2004; Sang e Blecha, 2008).

A evolução no campo da biologia molecular colaborou para a síntese de diferentes PAMs com o objetivo de obter moléculas de maior efetividade terapêutica, contra micro-organismos gram positivos e gram negativos, aliada a menor toxicidade e à conhecida toxicidade seletiva destes compostos. (Maloy e Kari, 1995; Machado *et al*, 2004; Reshmy *et al*, 2011; Jianget *al*, 2012; Wanget *al*, 2012). Esta se baseia em diferenças bioquímicas e estruturais entre as membranas de micro-organismos e animais. A bicamada lipídica da membrana bacteriana é composta por fosfolipídeos com carga negativa, voltados para fora da célula. Já nos animais, a composição da membrana é de fosfolipídeos neutros direcionados para o meio intracelular. Outra molécula que parece influenciar a seletividade é o colesterol, presente nas células animais, diminuindo a ação dos PAMs, e ausente nas células bacterianas (Hancock, 1998; Matsuzaki, 1998).

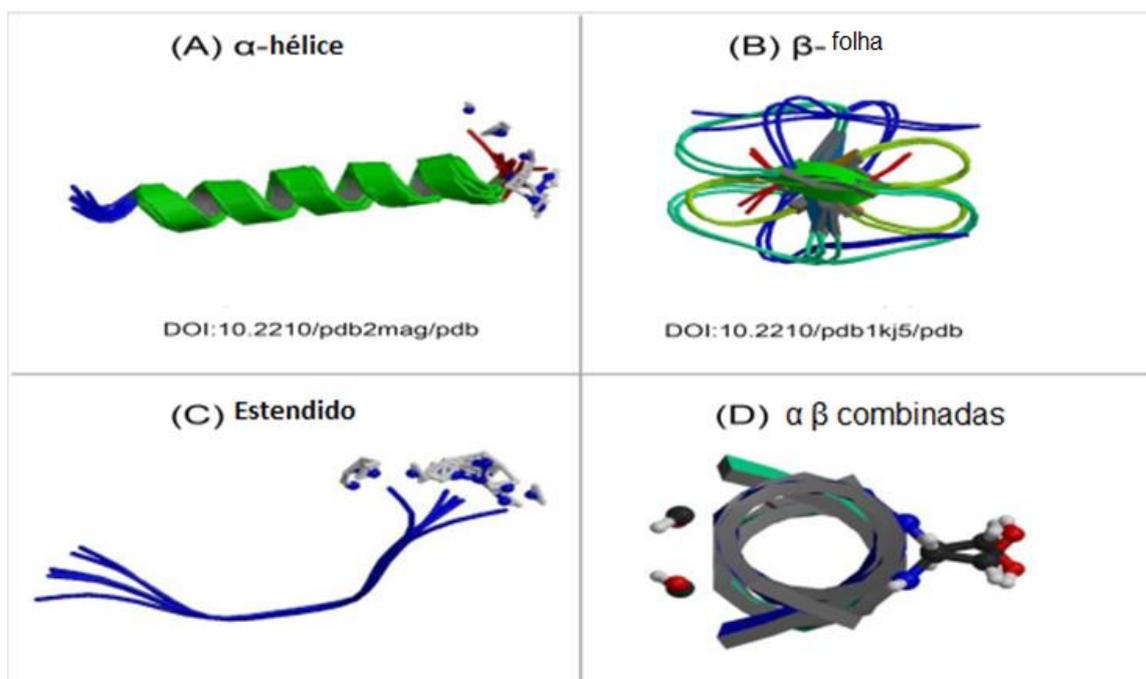
Existem mais de 1.700 peptídeos antimicrobianos isolados a partir de micro-organismos, plantas e animais vertebrados ou invertebrados. O principal alvo de alguns destes peptídeos é a bicamada da membrana das células atacadas, enquanto outros atravessam a membrana e causam lise celular através da ativação

de estruturas intracelulares (Marcotte *et al*, 2003; Brown e Hancock, 2006; Jiang, 2012). Peptídeos capazes de penetrar a célula provaram ser um eficiente sistema de entrega intracelular. O mecanismo de internalização peptídica primeiro envolve a interação com a matriz extracelular e é seguido, em muitos casos, por endocitose. Finalmente, dependendo do tipo de endocitose, um alvo intracelular é atingido (Pujal *et al*, 2006). Propriedades, como a anfipaticidade, alto conteúdo de peptídeos específicos (lisina ou glicina) e hidrofobicidade, são relatados como essenciais para um peptídeo atravessar uma membrana celular (Giralt *et al*, 2006).

A análise de peptídeos antimicrobianos de bactérias, plantas, insetos e anuros demonstrou que resíduos de glicina (Gly) e alanina (Ala) são mais abundantes em peptídeos bacterianos; resíduos Ala, Cys (cisteína) e Gly, mais comuns em peptídeos de plantas, Gly e Lys (lisina) são frequentemente encontrados em peptídeos de insetos, e os resíduos de Leu (leucina), Ala, Gly e Lys têm percentagens superiores a 10% em peptídeos de anuros. Um resumo destes resultados indica a notável utilização do resíduo Gly em peptídeos antimicrobianos em três reinos. Em contraste, o resíduo metionina (Met) é usado raramente (<1,5%). Curiosamente, Lys catiônico é preferido em relação Arg (arginina) em todos os reinos (Wang *et al*, 2008).

Classificar todos os PAM descobertos é uma tarefa complicada, portanto alguns autores desenvolveram sistemas de classificação baseados em sua estrutura secundária, sendo que outros associam a esta descrição, a composição de aminoácidos na molécula peptídica.

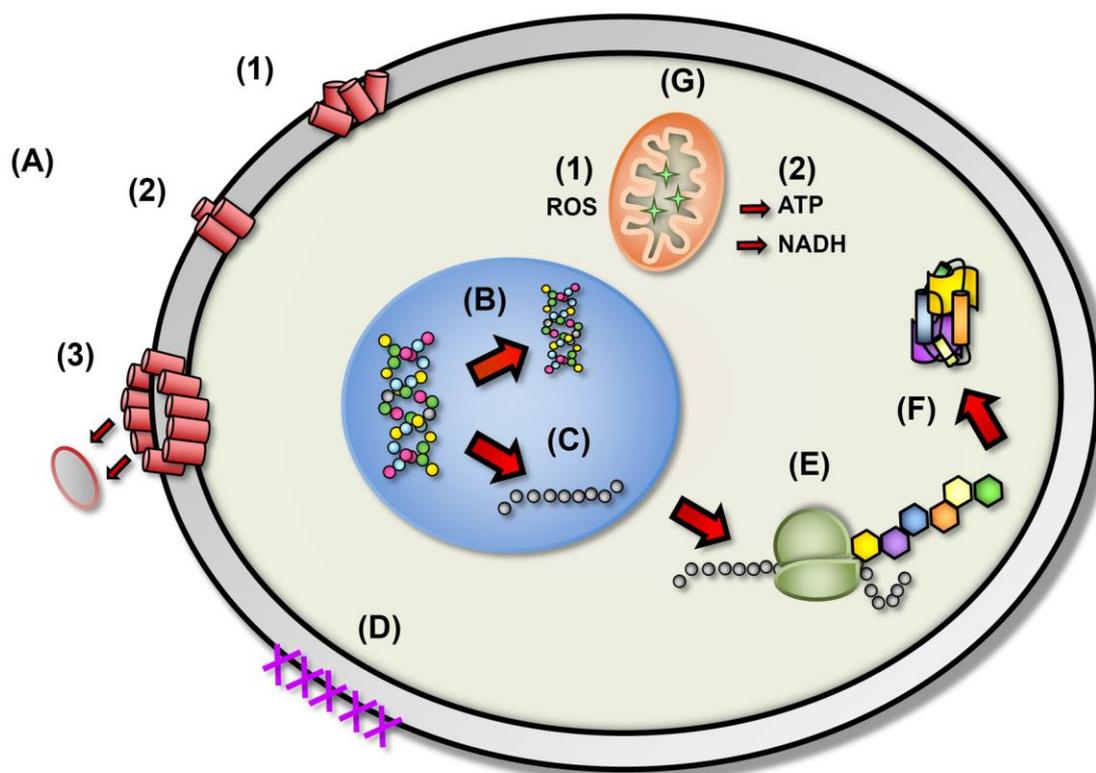
Segundo Wang em seu livro “Antimicrobial Peptides”, podem ser encontradas quatro tipos de estruturas peptídicas:  $\alpha$  hélice, Folha  $\beta$ ,  $\alpha$  hélice e folha  $\beta$  combinadas e, não  $\alpha$   $\beta$  (estendido), sendo estas últimas, ricas em um determinado tipo de aminoácido conforme a figura 1 (Wang, 2011).



**Figura 1:** Modelos representativos das diferenças estruturais entre as quatro classes de peptídeos antimicrobianos. Todas as estruturas foram obtidas livremente da Protein Data Bank RCSB (PDB) (<http://www.pdb.org/>).

Os PAM podem ser ainda classificados dependendo da localização de seus alvos: a membrana, ou outras estruturas não pertencentes à membrana. Em sua maioria, interagem com os fosfolípidos aniônicos das membranas de procariontes resultando em despolarização, aumento da permeabilidade, possibilitando o efluxo de íons e nutrientes essenciais com consequente lise da célula. A ruptura da membrana pode ser provocada por três mecanismos distintos (Figura 2)(Tuennemann *et al*, 2010; Peters *et al*, 2010; Wang, 2011):

- Formação de poros tipo barril: funcionando com canais que possibilitam o livre transporte de íons para dentro e fora da célula (Brodgen, 2005);
- Formação de poros toroidais: possibilitam o livre transporte de macromoléculas e íons através da membrana;
- Formação de um tapete na superfície da membrana: age como detergente e destrói completamente a membrana.



**Figura 2:** Os diversos mecanismos de ação propostos para peptídeos antimicrobianos em células microbianas. (A) Rompimento da membrana celular: (1) Inserção aleatória na membrana, (2) Alinhamento de sequências hidrofóbicas, e (3) Remoção de porções da membrana e formação de poros. (B) Inibição da síntese de DNA. (C) Bloqueio da síntese de RNA. (D) Inibição das enzimas necessárias para ligação de proteínas estruturais da membrana celular. (E) Inibição da função ribossomal e síntese de proteína. (F) Bloqueio das proteínas chaperona e de proteínas necessárias para dobramento adequado das mesmas. (G) Direcionamento para mitocôndria (alvo): (1) inibição da respiração celular (2) rompimento da membrana celular da mitocôndria e efluxo de ATP e NADH. Todas as estruturas foram obtidas livremente da Protein Data Bank RCSB (PDB) (<http://www.pdb.org/>).

PAM catiônicos são inicialmente atraídos para as cargas negativas existentes na membrana externa de bactérias gramnegativas, por exemplo, fosfolípidos aniônicos e grupos fosfato em lipopolissacarídeo (LPS) enquanto nas gram positivas, são atraídos pelos ácidos teicóicos presentes na superfície da célula. Há também indícios de que os peptídeos podem utilizar este mecanismo para atingir outros alvos tais como a membrana citoplasmática. Também se conhece a capacidade dos peptídeos em interferir na função ou sobrevivência da célula pela interação com alvos intracelulares, podendo inclusive, interferir no transporte de ácidos nucleicos (Giralt *et al*, 2006; Wang, 2011).

O desenvolvimento de resistência microbiana contra PAM é raro (Peschel e Sahl,2006). No entanto, alguns patógenos têm a capacidade de expressar mecanismos para contornar o alvo do peptídeo antimicrobiano e fugir das defesas do hospedeiro (Yeaman, 2003; Sperandio *et al*, 2008). Peptídeos antimicrobianos representam uma das mais promissoras estratégias para combater infecções e resistência a medicamentos antimicrobianos. Existe um grande interesse no desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos, já que em quatro décadas somente três foram encontradas. Além da provada atividade antibacteriana dos PAM utilizados isoladamente, ainda há a possibilidade de utilizá-los em associação sinérgica com moléculas já existentes (Marr,2006). Como a necessidade de novos antimicrobianos torna-se mais proeminente, a questão permanece: pode-se desenvolver novos medicamentos com base nos princípios de design de moléculas primitivas (Peter *et al*,2010)?

Os invertebrados apresentam um mecanismo de defesa contra micro-organismos baseado na produção de diferentes peptídeos antimicrobianos, uma vez que não são capazes de produzir moléculas com reconhecimento específico contra agressores, como as imunoglobulinas (Bulet *et al*,1999; Hoffmann *et al*,1999). Uma grande quantidade de novos PAM tem sido isolada da hemolinfa e da peçonha de diversos insetos e aracnídeos (Xu *et al*,2009; Zhao *et al*,2011; Otero-Gonzalez *et al*,2010; Jimenez *et al*,2012).

Neste contexto, os compostos isolados da peçonha de artrópodes têm despertado grande interesse científico na prospecção de novas drogas terapêuticas. Nos dias atuais, com o uso de novas técnicas de isolamento e identificação de compostos bioativos, o estudo da peçonha de animais proporciona uma abundância de possibilidades para a descoberta de compostos com potencialidade antimicrobiana (Mortari *et al*, 2012).

### **1.3. Peptídeos Antimicrobianos de Vespas**

A peçonha das vespas constitui-se de componentes específicos, os quais são produtos desenvolvidos ao longo de um elaborado processo evolutivo e utilizados efetivamente para a auto-defesa, captura e/ou imobilização das presas. A peçonha

de vespas sociais é formada por uma variedade de compostos bioativos, com diversas ações farmacológicas, entre elas a antimicrobiana (Habermann, 1972; Nakajima, 1986; Mortari *et al*, 2005; 2007; 2012). Vespas sociais produzem peptídeos com atividade muito superior, até dezoito vezes maior, que espécies solitárias, produzidos como barreira inicial contra a invasão microbiana das colônias (Stow *et al*, 2007; Hoggard *et al*, 2011). Diversos peptídeos bioativos foram isolados da peçonha de vespas. Tais peptídeos são classificados em famílias, segundo suas atividades biológicas e estruturas moleculares (Nakajima, 1986; Monteiro *et al*, 2009). Neste contexto, a classe mais amplamente descrita de peptídeos isolados a partir da peçonha de vespa são os mastoparanos (Mendes *et al*, 2004). Essa classe é caracterizada por peptídeos ricos em lisina e desempenham um papel fundamental na estimulação e liberação de aminas biogênicas como a histamina dos mastócitos, além disso, os mastoparanos apresentam uma potente atividade antimicrobiana (Mendes *et al*, 2005). Estruturalmente, os mastoparanos são peptídeos anfifílicos e apresentam-se em conformação  $\alpha$ -hélice, sem cisteínas em sua sequência primária que possui de 10 a 14 resíduos de aminoácidos (Nakajima *et al*, 1986). A grande quantidade de resíduos de lisina em suas cadeias tem como provável função facilitar a liberação de histamina dos mastócitos e conferir carga positiva à molécula aumentando sua afinidade com membranas biológicas que apresentem carga negativa (Higashima *et al*, 1990; Konno *et al*, 2000).

A atividade antimicrobiana destes peptídeos é gerada por interações com os lipídios de membrana e representa uma grande vantagem aos peptídeos antibióticos comerciais, devido ao fato da composição lipídica dessas membranas ser altamente conservada durante a evolução dos organismos. Como consequência, a atividade lítica é independente de receptores na membrana, o que dificulta o desenvolvimento de mecanismos de resistência, conferindo a estes peptídeos um grande potencial para serem utilizados como substitutos de antibióticos convencionais ou como novos desinfetantes (Mortari *et al*, 2012).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de um novo peptídeo isolado da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha*, em testes de inibição do crescimento bacteriano de cepas sensíveis e multirresistentes, por metodologia de disco difusão e microdiluição em caldo.

### 2.2. Objetivos específicos

- Isolar e identificar peptídeos com atividade antimicrobiana da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha*
- Determinar a atividade antimicrobiana do peptídeo, comparativamente em cepas sensíveis e multirresistentes, de bactérias gram positivas e de bactérias gram negativas;
- Comparar a concentração inibitória mínima do peptídeo e estudo e de antimicrobianos convencionais;

### 3. Materiale Métodos

#### 3.1. Coleta

Foi coletado um ninho da vespa social *Polybia dimorpha* na região Centro-Oeste em Brasília-DF, com a devida autorização de acordo com a Instrução Normativa nº 154, de março de 2007 do IBAMA (licença do IBAMA número 21723-1).

Os espécimes de himenópteros coletados foram gentilmente identificados pelo Prof. Dr. Fernando B. Noll do Departamento de Zoologia e Botânica da Unesp e exemplares foram depositados na Coleção de Hymenoptera da UNESP e na Coleção do Laboratório de Toxinologia da UnB.



**Figura 3:** Foto de exemplar de uma fêmea de *Polybia dimorpha* (foto de Fernando B. Noll).

#### 3.2. Preparação da peçonha – Obtenção e Preparação

Após a coleta, os exemplares foram eutanasiados por congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior retirada da peçonha. Os reservatórios contendo a peçonha bruta e as glândulas produtoras de peçonha foram retirados com uma pinça e acondicionados em um tubo plástico de 1,5 mL, durante este processo, todo o material foi mantido resfriado entre  $6^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, este material era macerado, homogeneizado em

água deionizada e centrifugado a 10.000 xg por 3 minutos a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi retirado, congelado e seco no *speedVac*, obtendo-se assim os extratos brutos da peçonha liofilizados.

A peçonha bruta então foi solubilizada em 1:1 de água e acetonitrila e ultrafiltrada utilizando um filtro Microcon (Millipore®), ao final obteve-se apenas os compostos com massas moleculares inferiores a 3000 Da, denominados compostos de baixa massa molecular (CBMM).

### **3.3. Separação dos componentes**

O isolamento dos componentes da peçonha foi realizado por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em um sistema Shimadzu® Prominence. Foi utilizada uma coluna de fase reversa (C18 ODS, 15 µm, 250 x 10 mm Phenomenex®) utilizando 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água, como solvente A e 0,1% de TFA em acetonitrila, como solvente B, em gradiente linear, com fluxo de 1,5 mL/min. A absorvância foi monitorada a 216 e 280nm, sendo as frações coletadas manualmente, e secas a vácuo.

### 3.5. Linhagens Bacterianas

BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS: *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 25923, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA); *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina.

BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS: *Escherichia coli* ATCC25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853; *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606; *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo KPC; *Escherichia coli* produtora de betalactamase de espectro estendido (ESBL); *Pseudomonasaeruginosa* resistente a carbapenens por produção de metalo-betalactamases.

As cepas padrão ATCC foram adquiridas da empresa BioMerieux, encontradas como parte integrante dos kits “Lyfocults ®”, de controle da qualidade

do equipamento Vitek 2®, BioMérieux. Já as cepas multirresistentes fazem parte de uma bacterioteca das pesquisadoras, mantida congelada em freezer a -70°C , no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Brasília (UNICEUB).

### **3.6. Reconstituição das cepas para os ensaios**

Cepas ATCC que foram adquiridas como uma solução de controle de qualidade, com estirpes licenciadas pela ATCC (American Type Culture Collection), acondicionados em um frasco independente descartável passaram por uma hidratação imediata, sem pré-incubação, e a vareta de inoculação foi utilizada para o isolamento em placa. Para a utilização, o frasco que contém o diluente foi rompido, reidratando assim o organismo liofilizado, que foi transferido imediatamente para uma placa de Agar sangue a 5%, e incubada por 20 horas entre 35 e 37 °C.

As cepas de micro-organismos multirresistentes estão armazenadas congeladas em criotubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 2,5% de glicerol e miçangas removíveis. Após a retirada do tubo do freezer, retirou-se uma das miçangas e esta foi colocada em tubo contendo caldo BHI, levado à estufa entre 35 e 37° C, por 4 a 8 horas, ou até ser possível observar turbidez no caldo. Posteriormente, uma pequena parte foi transferida com um alça bacteriológica para placas de Agar Sangue de carneiro a 5%, submetidas a uma incubação *overnight*.

As colônias crescidas nas placas foram submetidas à identificação e antibiograma no equipamento de automação Vitek 2® (BioMérieux), para confirmação do comportamento fenotípico esperado, avaliando a correta identificação bacteriana e a estabilidade nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos.

Feitas as confirmações necessárias, que demoraram em média 7 horas, as colônias das placas foram utilizadas nos ensaios com o peptídeo antimicrobiano estudado.

### **3.7. Preparação do inóculo**

Para a preparação do inóculo foram selecionadas de três a cinco colônias, bem isoladas, e uma suspensão direta da colônia foi realizada em tubos contendo 10 mL de caldo Mueller Hinton cátions ajustado (Plastlabor ®), conforme padrão 0,5 da escala de MacFarland. A turbidez da suspensão foi medida por absorvância em espectrofotômetro, utilizando-se um comprimento de onda igual a 625 nm. Alcançando leitura entre 0,08 e 0,10 a diluição pode ser utilizada (CLSI, 2012).

Foi realizada uma confirmação da obtenção da turbidez necessária em densitômetro do equipamento automatizado Vitek 2 ® BioMerieux. No caso de discordância entre as leituras, a suspensão foi descartada, e nova diluição realizada.

### **3.8. Ensaio de Disco-difusão**

Para os testes de disco-difusão foi utilizada uma suspensão a 0,5 de McFarland, que alcança uma concentração de aproximadamente de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Esta solução foi semeada em ágar Mueller-Hinton e em seguida, discos de papel de filtro estéreis (6 mm) impregnados com 10 µL de uma solução do peptídeo, com DMSO 2,5%, nas respectivas concentrações (1, 30, 50, 100, 150, 200 e 400 µg/mL) foram colocados sobre a superfície do ágar inoculado. Após incubação por  $\pm 24$  horas a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , procurou-se a formação de halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco. Os solventes bem como os diluentes utilizados na dissolução do filtrado foram usados como controle negativo.

### **3.9. Ensaio de Microdiluição em Caldo**

Para a realização de microdiluição em caldo, foi necessária uma diluição de 1:15 a partir da suspensão inicial padrão 0,5 de MacFarland, em caldo Mueller Hinton cátions ajustado para obtenção de uma concentração de  $1 \times 10^5$  UFC/mL. Em poços de placa de Elisa de 96 poços, foram adicionados 20 µL do inóculo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

### **3.9.1. Diluição dos antimicrobianos para o controle positivo de inibição**

Foram utilizadas como controle positivo da inibição do crescimento Polimixina B (Sigma®) e Meropenem (Sigma®), para as cepas gram negativas e Vancomicina (Sigma®) para as cepas gram positivas. As drogas foram diluídas em 180 µl de caldo Mueller-Hinton com DMSO a 2,5%, e pipetadas nos poços de controle exatamente nas mesmas proporções que o peptídeo em estudo, em apenas duas concentrações, 10 µg/mL e 100µg/mL.

### **3.9.2. Diluição do peptídeo**

As diluições do peptídeo foram realizadas em caldo Mueller-Hinton com DMSO a 2,5%, nas seguintes concentrações: 1, 30, 50, 100, 150, 200 e 400 µg/mL. Cada poço recebeu 180 µL de caldo com o peptídeo diluído e 20 µL de inóculo bacteriano.

### **3.10. Controle negativo de inibição**

Como controle de crescimento bacteriano, ou seja, controle negativo de inibição foi utilizado 20 µL de inóculo bacteriano, e 180 µL de caldo Mueller-Hinton com DMSO a 2,5%, sem adição de antimicrobianos ou do peptídeo.

### **3.11. Controle negativo de crescimento (branco)**

Para o controle negativo de crescimento foi utilizado apenas 200 µL de caldo Mueller-Hinton com DMSO a 2,5%.

### 3.12. Leitura do resultado

Foi realizada na leitora de ELISA MultiSkan F C® Thermo Scientific, em faixa de leitura de 595 nm.

### 3.13. Cálculo da porcentagem de inibição do crescimento bacteriano

Para a interpretação dos testes de microdiluição em caldo foi realizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), que é a menor concentração de droga capaz de inibir o crescimento bacteriano (50 e 100%)(Lorian, 1996; CLSI, 2012).

A porcentagem de crescimento bacteriano 24 horas após o início do experimento foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ de crescimento} = \frac{(\text{DO obtida} - \text{DO contr. negativo})}{(\text{DO contr. positivo} - \text{DO contr. negativo})} \times 100$$

O número resultante deste cálculo corresponde à porcentagem de crescimento em cada poço de teste. Posteriormente, O resultado deste cálculo foi então subtraído de 100, para encontrar a porcentagem de inibição de crescimento, aquela capaz de inibir 50 e 100% do crescimento bacteriano ficou então determinada como a MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>100</sub> do peptídeo, respectivamente.

## 4. Resultados

---

#### **4.4. Atividade antimicrobiana**

Inicialmente, foram realizados testes para verificar o melhor método para a avaliação de peptídeos isolados de vespas. Para tanto, foram utilizados dois métodos de antibiograma: inibição por método de disco de difusão e inibição por microdiluição em caldo. Nos dois testes, a atividade antibacteriana do peptídeo em estudo, nas concentrações de 1µg/mL; 5µg/mL; 30µg/mL; 50µg/mL; 100µg/mL; 150µg/mL; 200µg/mL; 400µg/mL, foi testada contra bactérias padrão ATCC, apenas no teste de microdiluição foi avaliada a atividade do peptídeo em relação a cepas multirresistentes.

Nos ensaios de disco difusão, para avaliação da zona de inibição de crescimento bacteriano, não foi evidenciada atividade em nenhuma das cepas padrão testadas. Em todos os ensaios não houve formação de halos de inibição de crescimento na superfície das placas de ágar Mueller Hinton. Em contrapartida, nos ensaio por microdiluição em caldo, o peptídeo apresentou atividade contra as quatro bactérias padrão testadas conforme apresentado na TABELA 01.

**Tabela 1:** Resposta nos testes de disco difusão e microdiluição em caldo.

	MICROORGANISMOS	Disco – difusão	Microdiluição em caldo
<b>Gram Positivos</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	+
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilinaMRSA	NA	+
	<i>Enterococcus faecalis</i> resistente a vancomicina	NA	+
<b>Gram Negativos</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	-	+
	<i>Escherichia coli</i> (ESBL+)	NA	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KPC +)	NA	+
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenens	NA	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i> Complex resistente a carbapenens	NA	+

Legenda: (-) Impossibilidade de leitura. (+) Leitura com possibilidade de análise. NA, não avaliado.

Uma vez que o efeito somente foi observado utilizando o método de diluição em caldo, optou-se por realizar os testes para a determinação do MIC e das curvas dose-resposta apenas com este método.

A ação do peptídeo em estudo sobre o crescimento de cepas padrão ATCC pode ser visualizada na tabela 02 e figuras 7 a 11. O efeito do peptídeo foi mais significativo contra cepas de *Staphylococcus aureus*, com uma MIC<sub>50</sub> de 4,1µg/mL do peptídeo. Contra as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* seriam necessárias concentrações superiores a 400µg/mL, logo, neste estudo não foi possível calcular com maior precisão a MIC<sub>50</sub> ou MIC<sub>100</sub>. O desempenho do peptídeo para inibir

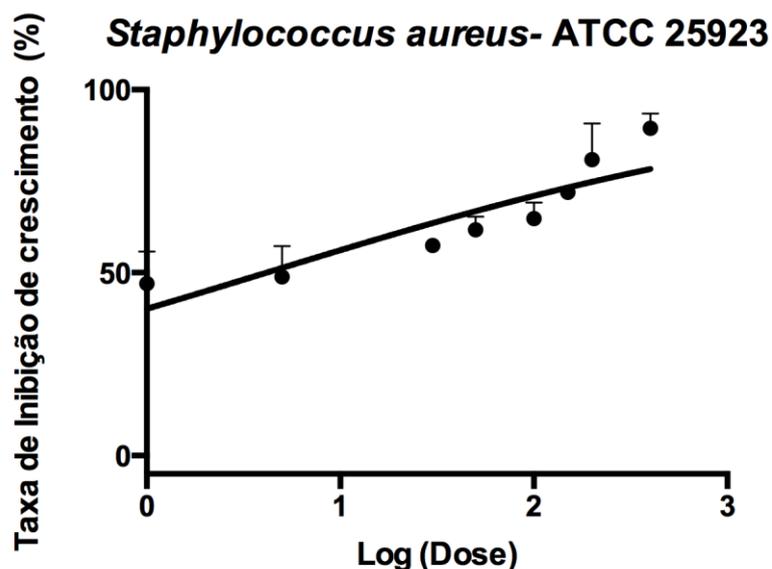
50% dos micro-organismos viáveis, também foi eficaz frente às cepas de *Enterococcus faecalis* (73,2µg/mL), *Acinetobacter calcoaceticus*(84µg/mL), e em *Escherichia coli* (50,73 µg/mL), sendo esta última, a bactéria gram negativa com uma resposta mais significativa.

Em relação ao MIC100, foram observados valores iguais ou superiores a 400 µg/mL do peptídeo para todas as bactérias testadas.

Tabela 2: Comparação entre MIC50 e MIC100 em Cepas Padrão

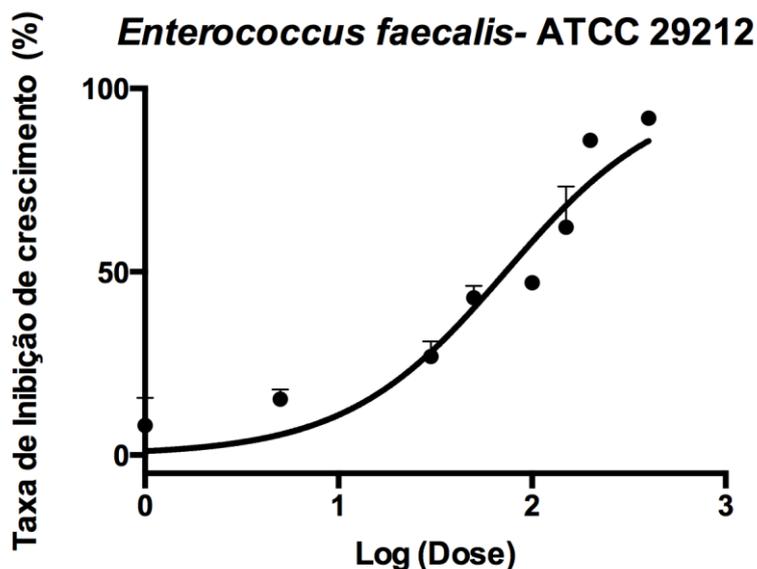
Concentração Inibitória Mínima do Peptídeo em Cepas Padrão ATCC (µg/mL)					
MIC	<i>S.aureus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>A. calcoaceticus</i>
MIC <sub>50</sub>	4,1 (1,5-11,5)	73,2 (56,0 – 95,6)	50,73 (33 – 78)	> 400	84 (65-109)
MIC <sub>100</sub>	400	400	> 400	> 400	> 400

A relação entre o aumento das doses de peptídeo e a inibição do crescimento bacteriano é bem evidenciada nas referidas curvas dose-resposta, que possibilitam inclusive, a percepção da MIC50 e do efeito dose dependente. Sendo assim, os percentuais de inibição encontrados demonstraram que a atividade sobre o crescimento bacteriano é proporcional ao aumento da dose testada. Na figura 7 pode-se observar a potente inibição do peptídeo sobre as cepas de *Staphylococcus aureus*.



**Figura 7:** Taxa de inibição de crescimento de bactérias *Staphylococcus aureus* pelo peptídeo identificado da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha*.  $R^2=0,7253$ .

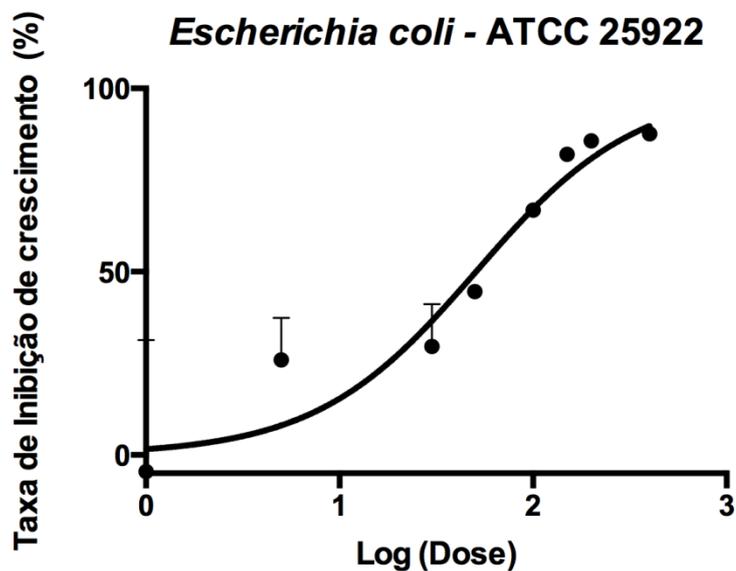
Na figura 8, é apresentado o impacto da presença do peptídeo sobre a taxa de crescimento de *Enterococcus faecalis*.



**Figura 8:** Taxa de inibição de crescimento de bactérias *Enterococcus faecalis* pelo peptídeo identificado da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha*.  $R^2=0,9125$ .

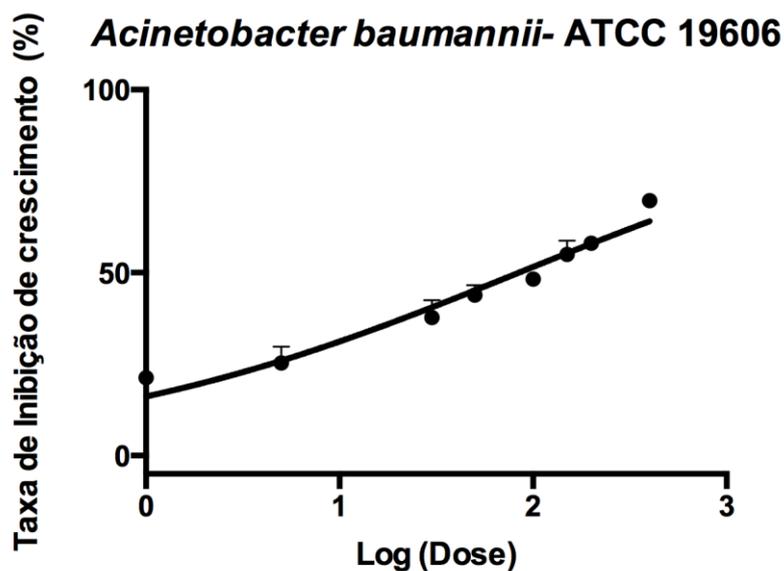
Entre as bactérias gram negativas ensaiadas, a *Escherichia coli*, cuja curva do comportamento pode ser avaliada na figura 9, sofreu inibição do crescimento na presença de doses menores que o observado em *Pseudomonas* e o *Acinetobacter*,

e se comparada com os cocos gram positivos, obteve um desempenho também melhor que os enterococos.



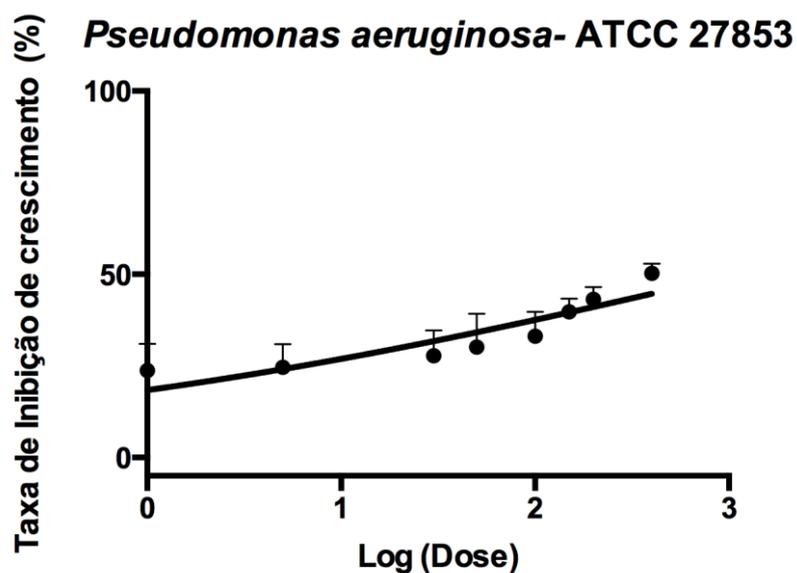
**Figura 9:** Taxa de inibição de crescimento de bactérias *Escherichia coli* pelo peptídeo identificado da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha*.  $R^2=0,8538$ .

A figura 10 representa o desempenho do peptídeo contra o crescimento das bactérias da cepa de *Acinetobacter calcoaceticus*, sendo possível afirmar, que também neste caso, a resposta à presença deste peptídeo é dose dependente, sendo o efeito mais discreto que o encontrado para *aE. coli*.



**Figura 10:** Taxa de inibição de crescimento de bactérias *Acinetobacter baumannii* pelo peptídeo identificado da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha*.  $R^2 = 0,9414$ .

Interessantemente, no estudo com a cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, a inibição do crescimento também foi positiva, entretanto, a utilização de doses mais elevadas foi necessária. A figura 11 evidencia a fraca inibição desta bactéria, mesmo diante de concentrações mais elevadas do peptídeo.



**Figura 11:** Taxa de inibição de crescimento de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* pelo peptídeo identificado da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha*.  $R^2 = 0,6593$ .

Para a validação dos testes, fármacos antimicrobianos comerciais foram testados frente as mesmas cepas padrão, para as quais as taxas de inibição encontradas foram elevadas, e estão compondo a tabela 3. Estes dados já eram esperados, pois estas cepas não expressam genes de resistência e a sua utilização, como citado anteriormente, é importante para o controle da qualidade dos ensaios.

**Tabela 3:** Taxa de Inibição de Fármacos antimicrobianos comerciais avaliados contra cepas padrão ATCC

Taxa de Inibição do Crescimento Bacteriano Média $\pm$ EPM (%) em Cepas Padrão ATCC						
Fármaco	Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. calcoaceticus</i>
Vancomicina	10	90,9 $\pm$ 1,3	74,6 $\pm$ 2,3	NT	NT	NT
	100	95,2 $\pm$ 0,7	89,7 $\pm$ 0,4	NT	NT	NT
Meropenem	10	NT	NT	97,5 $\pm$ 1,7	94,9 $\pm$ 4,8	99,0 $\pm$ 0,6
	100	NT	NT	96,1 $\pm$ 0,05	96,7 $\pm$ 5,3	100,1 $\pm$ 0,8
Polimixina B	10	NT	NT	87,6 $\pm$ 6,7	98,9 $\pm$ 0,1	92,5 $\pm$ 1,75
	100	NT	NT	85,3 $\pm$ 5,3	97,9 $\pm$ 2,0	99,8 $\pm$ 0,1

Legenda: NT- Não testada por não haver indicação de uso.

Para a confirmação do comportamento esperado das cepas utilizadas neste estudo, foram testados fármacos comerciais com ação reduzida ou inexistente na presença de bactérias com a expressão de genes de resistência, como por exemplo a vancomicina em cepas VRE, e o meropenem em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter, sp.* Paralelamente, foram ensaiados antimicrobianos indicados no tratamento das infecções causadas pelos micro-organismos multirresistentes estudados nesta pesquisa, como por exemplo a vancomicina em cepas MRSA e polimixina B nas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter, sp.* A tabela 4 permite observar que a ação da vancomicina sobre as cepas de MRSA foi obtida semelhantemente nas concentrações de 10µg/mL e 100 µg/mL, acima de 90%. A cepa de VRE apresentou taxas de inibição muito baixas, inferiores a 30%, pois a resistência expressa por este micro-organismo é justamente à vancomicina. Quanto aos resultados do imipenem, observou-se apenas inibição da *E.coli* produtora de ESBL, que é a única bactéria gram negativa multirresistente testada que responde à terapia com este fármaco. As bactérias KPC, *P.aeruginosa* e *A. calcoaceticus baumannii Cplx*, expressam resistência a carbapenens, mantendo a suscetibilidade à polimixina B.

**Tabela 4:** Taxa de inibição de fármacos comerciais contra bactérias multirresistentes (MDR).

Taxa de Inibição do Crescimento Bacteriano Média $\pm$ EPM (%) em Bactérias Multirresistentes							
CGPBGN							
Fármaco	Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )	MRSA	VRE	E. coli ESBL	KPC	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>
Meropenem	10	NT	NT	93,0 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,07	1,8 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,05
	100	NT	NT	98,6 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,02	0,5 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,4
Polimixina B	10	NT	NT	100,5 $\pm$ 0,5	99,0 $\pm$ 0,7	99,8 $\pm$ 0,0	88,5 $\pm$ 1,2
	100	NT	NT	99,8 $\pm$ 0,05	100,0 $\pm$ 0,5	99,4 $\pm$ 0,5	98,3 $\pm$ 1,3
Vancomicina	10	90,7 $\pm$ 0,05	26,5 $\pm$ 0,8	NT	NT	NT	NT
	100	95,4 $\pm$ 0,4	29,0 $\pm$ 0,2	NT	NT	NT	NT

Legenda: NT- Não testada por não haver indicação de uso

A avaliação da capacidade inibitória do peptídeo contra as cepas com expressão de mecanismos de resistência pode ser visualizada na tabela 5. A atividade encontrada contra as cepas multirresistentes é muito superior à das cepas padrão. Taxas de inibição tendendo a 100% foram obtidas com todas as diluições de peptídeo testadas, o que não permitiu o cálculo da MIC<sub>50</sub>. Mesmo quando a concentração de 1 µg/mL foi utilizada, a reposta foi intensa. Como os resultados foram muito próximos em todas as diluições, a confecção de gráficos para acompanhamento do desempenho dos testes foi prejudicada.

**Tabela 5:** Comportamento das Cepas MDR, frente ao peptídeo.

<b>Taxa de Inibição de Crescimento Bacteriano Média <math>\pm</math>EPM (%)</b>							
<b>Dose</b>	<b>Log de Dose</b>	<b>CGP</b>		<b>BGN</b>		<b>BGNNF</b>	
( $\mu$ g/mL)		MRSA	VRE	E.coliESBL+	KPC	P.aeruginosa	Acinetobacter,sp
400	2,6	105,5 $\pm$ 0,8	106,0 $\pm$ 1,9	100,1 $\pm$ 0,3	109,6 $\pm$ 0,8	101,6 $\pm$ 0,5	103,3 $\pm$ 0,4
200	2,3	105,1 $\pm$ 0,1	108,7 $\pm$ 13,4	99,8 $\pm$ 0,5	108,0 $\pm$ 0,5	101,1 $\pm$ 0,3	103,3 $\pm$ 0,7
150	2,2	104,4 $\pm$ 0,4	105,7 $\pm$ 14,4	99,7 $\pm$ 0,7	107,0 $\pm$ 1,7	99,8 $\pm$ 0,2	101,9 $\pm$ 0,2
100	2,0	102,4 $\pm$ 0,4	104,9 $\pm$ 13,8	99,1 $\pm$ 0,1	105,5 $\pm$ 0,1	99,5 $\pm$ 0,2	101,9 $\pm$ 0,5
50	1,7	101,5 $\pm$ 0,3	105,2 $\pm$ 12,6	100,0 $\pm$ 0,4	105,1 $\pm$ 0,7	100,3 $\pm$ 0,6	101,3 $\pm$ 0,2
30	1,5	101,3 $\pm$ 0,2	102,7 $\pm$ 13,5	99,7 $\pm$ 0,1	104,2 $\pm$ 0,2	100,3 $\pm$ 0,9	100,7 $\pm$ 0,2
5	0,7	99,2 $\pm$ 0,8	99,4 $\pm$ 11,5	100,0 $\pm$ 0,1	102,7 $\pm$ 1,2	100,9 $\pm$ 1,1	100,1 $\pm$ 0,6
1	0,0	97,6 $\pm$ 0,1	98,5 $\pm$ 11,6	100,2 $\pm$ 0,3	97,8 $\pm$ 1,3	100,9 $\pm$ 0 ,3	87,4 $\pm$ 1,7

## 5. Discussão

A crescente preocupação com a capacidade de adaptação das bactérias frente à imensa disponibilidade de compostos químicos usados especificamente como antimicrobianos, mas também àqueles utilizados na agricultura, pecuária, domicílios, como pesticidas, promotores de crescimento e produtos de limpeza respectivamente, tem motivado a pesquisa de novos compostos capazes de exercer algum tipo de atividade contra micro-organismos patogênicos.

Com a evolução dos procedimentos médicos, observa-se um aumento na incidência de infecções graves. O prolongamento da vida dos pacientes pelo uso de novas técnicas e drogas tem aumentado consideravelmente a expectativa de vida desde a descoberta de antibióticos, mas também aumentam o tempo de permanência no hospital, tornando estes pacientes continuamente suscetíveis a inúmeras infecções por bactérias da microbiota endógena, e da microbiota exógena.

A presença de mecanismos de resistência em bactérias pertencentes à microbiota endógena é um fator de preocupação a mais no manejo das infecções, como pôde ser observado com o surgimento da *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo KPC. Isto é relevante porque diferentemente das bactérias ambientais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* Complex, quando bactérias endógenas colonizam tecidos aos quais as mesmas são adaptadas, não é possível reverter o quadro de portador, e o paciente permanece colonizado indefinidamente, mesmo que os testes de triagem sejam negativos. Pacientes portadores de micro-organismos resistentes são freqüentes disseminadores dos mesmos, principalmente quando são reintegrados ao convívio social. Com isto, o perfil das infecções vem mudando, primeiramente, não sendo mais relacionadas ao local onde o paciente é tratado, e sim ao tipo de assistência recebida, independente de ser prestada no hospital, em clínicas de hemodiálise, de hemoterapia, quimioterapia ou serviços de *home-care*, e os relatos de infecções por bactérias multirresistentes tem se tornado frequente em pacientes da comunidade (Cohen, 1992; Calfee e Jenkins, 2008; Nordmann *et al*, 2011).

De forma divergente, a disponibilidade de novas drogas antimicrobianas diminui de forma preocupante, resultado de uma série de fatores que conjuntamente

ameaçam a capacidade de combate a infecções, por mais simples que possam ser. A possibilidade de perda da ação e eficácia das moléculas que demandaram grandiosos investimentos financeiros, pelo simples compartilhamento de elementos genéticos móveis entre as bactérias, as crescentes quebras de patentes em vários países, inclusive no Brasil, a impossibilidade de acesso homogêneo aos novos medicamentos lançados no mercado, em contraste com a demanda gerada pelos medicamentos de uso contínuo, tornou a pesquisa de novos antimicrobianos, um potencial gerador de déficit ou de escassos e efêmeros lucros para as grandes indústrias farmacêuticas. Sendo assim, as promissoras descobertas resultantes das pesquisas sobre produção de peptídeos antimicrobianos relacionados à imunidade natural, projetam potencial sucesso na incessante luta contra bactérias patogênicas.

O peptídeo utilizado nesta pesquisa foi isolado da peçonha da vespa social *Polybia dimorpha* encontrada no cerrado brasileiro. Os resultados demonstram uma importante atividade antimicrobiana contra bactérias sensíveis, mas também, contra bactérias portadoras dos mais elaborados mecanismos de resistência descritos até o momento.

Na tabela 1 estão apresentados os dados gerados comparativamente entre as metodologias de disco-difusão e microdiluição em caldo para todos os micro-organismos estudados. Como as bactérias padrão ATCC foram utilizadas na triagem da sensibilidade ao peptídeo e na validade e acuidade das técnicas utilizadas, não há dados referentes a este método para as cepas multirresistentes.

A técnica de disco-difusão não se mostrou eficaz, pois em nenhum dos ensaios realizados foi observado halo de inibição do crescimento bacteriano. Tal fato possivelmente ocorreu em função do caráter hidrofóbico do peptídeo, visto que ele elui em uma porcentagem de 60% de ACN na cromatografia. A hidrofobicidade é uma característica comum aos peptídeos antimicrobianos isoladas da peçonha de vespas, como os mastoparanos que são eluidos na mesma faixa de concentração de ACN que o peptídeo do presente estudo (Mendes *et al*, 2004; Mendes *et al*, 2005). Isto pode ter favorecido sua adesão ao papel de filtro utilizado como ponto inicial de difusão no ágar, e dificultado a difusão no meio sólido, mesmo estando dissolvido em 2.5 % de dimetilssulfóxido (DMSO). Em contrapartida, nos ensaios realizados pela técnica de microdiluição em caldo houve inibição do crescimento

tanto das cepas padrão, quanto das multirresistentes testadas. Estes testes iniciais foram importantes para confirmar a validade e acuidade do método para pesquisar a interação entre o peptídeo e os micro-organismos testados, permitindo a realização dos testes com cepas multirresistentes, que são o objetivo maior da pesquisa.

Wang e colaboradores 2012 também demonstraram atividade inibitória de peptídeos de vespas da espécie *Polybia paulista* contra cepas padrão gram negativos e gram positivos, as mesmas testadas nesta pesquisa. Como o trabalho destes autores objetivou a descrição de peptídeos para serem usados como preservativos em alimentos, não foi avaliada a atividade contra cepas resistentes.

A inibição do crescimento bacteriano encontrada nestes ensaios contra bactérias padrão, foi também demonstrada por Rangel e colaboradores 2011 em um estudo que descreveu quatro novos peptídeos extraídos de vespas *Eumenes rubrofemoratus* e *Eumenes fraternulus*. Os resultados obtidos contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 entre outras cepas padrão, mostraram uma eficiente inibição do crescimento em baixas concentrações dos quatro peptídeos testados, com MICs variando entre 30µM e > 60µM nas bactérias gram positivas e entre 15µM e > 60µM nas bactérias gram negativas. Nesta dissertação também obteve-se uma importante inibição do crescimento das mesmas cepas citadas no estudo realizado por Rangel e colaboradores 2011, a saber: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606.

O peptídeo deste estudo mostrou efetividade na inibição do crescimento bacteriano das cepas padrão, alcançando uma inibição de 100% em concentrações superiores a 400 µg/mL. Através do cálculo da MIC<sub>50</sub>, pode-se comparar a resposta entre as diferentes cepas testadas. Na tabela 2 pode-se verificar que apesar dos resultados de inibição total ocorrerem em todas as cepas na maior dose utilizada, com exceção da *P.aeruginosa*, é evidente a melhor resposta contra *S. aureus*, pois a MIC<sub>50</sub> foi atingida com uma dose de 4,1 µg/mL. *E. faecalis* respondeu de forma mais discreta, necessitando de doses consideravelmente maiores que *S.aureus*. Classicamente o enterococo é conhecido por apresentar resistência intrínseca a uma série de antimicrobianos, consequência da baixa permeabilidade da membrana

a algumas moléculas, por exemplo, os betalactâmicos, podendo existir também uma menor permeabilidade ao peptídeo aqui estudado, o que explicaria a resposta inferior à do estafilococo (Shepard e Gilmore,2002).

Ao examinar os bacilos gram negativos, encontra-se a resposta da enterobactéria *E.coli*, melhor que a das não fermentadoras *P.aeruginosa* e *Acinetobacter calcoaceticus*, muito possivelmente também em função das membranas menos permeáveis, componentes da estrutura celular destas últimas, que são descritas como bactérias com elaborados mecanismos de resistência intrínseca (Nikaido,1989; Livermore,2003; Harbarth e Samore,2005).

Um estudo comparativo dos gráficos 07 a 11 permite uma visualização mais objetiva do desempenho do crescimento de cada cepa ATCC na presença do peptídeo. Existe uma relação de dependência entre o aumento do log de dose e a resposta de inibição em todos os gráficos, inclusive para *P.aeruginosa*, que não teve sua reprodução reduzida de forma equivalente às demais cepas.

A tabela 3 reúne os dados de resposta das cepas padrão frente aos fármacos escolhidos para acompanhamento da suscetibilidade clássica destes micro-organismos. As taxas de inibição foram elevadas e podem servir de referência para comparações com nosso peptídeo. A análise da capacidade de inibição do peptídeo comparada à dos antimicrobianos convencionais para as cepas padrão de gram negativos, demonstrou uma menor atividade quando comparadas as concentrações suficientes para promover inibição equivalente entre o peptídeo e as drogas meropenem e polimixina B. Para as bactérias gram positivas, nos testes com *Enterococcus faecalis* foram encontradas porcentagens de inibição em doses médias superiores à evidenciada com utilização de vancomicina. Quando se avalia o *Staphylococcus aureus*, a resposta ao peptídeo tendeu à similaridade com a vancomicina se a análise for exclusivamente pela MIC<sub>50</sub>, mas mostra-se inferior quando o foco é a MIC<sub>100</sub>, já que a menor concentração necessária neste caso foi superior a 400 µg/mL, muito superior aos 100µg/mL de vancomicina que resultam em taxa média de inibição de 95,2%.

Os resultados encontrados demonstram que o desempenho do peptídeo no controle do crescimento bacteriano de bactérias sensíveis é inferior ao dos antimicrobianos convencionais, muito possivelmente porque estes têm sítios de ligação específicos

na estrutura bacteriana e na ausência de mecanismos de resistência podem chegar com maior facilidade aos sítios alvo e se ligar livremente a eles (Konget *al*, 2010). O acúmulo de agentes antimicrobianos no seu local de ação, é a soma do transporte para a célula, da inativação durante o processo de transporte e da eliminação do agente antimicrobiano da célula (Konemanet *al*, 2008). Como nestas cepas padrão não há inativação, nem eliminação do antimicrobiano da célula, todas as moléculas transportadas conseguem atingir seus sítios alvo, com conseqüente sucesso na eliminação do micro-organismo.

O comportamento fenotípico dos micro-organismos gram negativos multirresistentes testados difere das cepas padrão pela capacidade de produção de betalactamases de espectro estendido e carbapenemases. Estas, presentes em grande concentrações no espaço periplasmáticos, inativam os betalactâmicos por hidrólise do anel. O principal mecanismo de resistência das bactérias gram positivas é caracterizado pela mudança dos sítios alvo das moléculas de antimicrobianos, geralmente localizados na membrana plasmática ou na parede celular (Hancock, 1998; Slama, 2008; Rice, 2006; Konget *al*, 2010).

Os micro-organismos resistentes escolhidos para este estudo apresentam expressão de elaborados mecanismos de resistência adquirida, que foram descritos fenotipicamente nos estágios de seleção e confirmação de identificação e suscetibilidade das cepas a serem testadas. Assim como para as bactérias padrão, o acompanhamento da resposta aos fármacos indicados para tratamento de infecções por estas cepas possibilita o controle do desempenho da qualidade dos testes aqui realizados, mas também é objeto de comparação da eficácia da molécula proposta com nova alternativa por esta pesquisa. Na tabela 4, a suscetibilidade a polimixina B encontrada nas cepas que apresentam resistência aos carbapenens salienta a diferença mais marcante entre estas cepas e as padrão ATCC. Os resultados são compatíveis com o esperado para cepas multirresistentes e atestam a boa acurácia e sensibilidade dos ensaios. As mesmas colocações podem ser aplicadas aos ensaios com os cocos gram positivos em relação à vancomicina.

A tabela 5 agrupa as médias de concentrações inibitórias mínimas resultante da exposição das cepas multirresistentes ao peptídeo estudado. Surpreendentemente, houve uma potente inibição do crescimento bacteriano, até

mesmo na menor concentração de peptídeo utilizada. As menores concentrações das soluções de peptídeo utilizadas 1 µg/mL e 5 µg/mL foram capazes de inibir 100 % do crescimento em gram negativas e gram positivas respectivamente. A resposta foi tão intensa, que os cálculos estatísticos aplicados à análise das cepas padrão foram inviabilizados para estes dados. A MIC<sub>50</sub> não foi calculada e os gráficos de acompanhamento da curva de crescimento não são suficientes para expressar a relação dose/resposta, uma vez que uma resposta semelhante foi encontrada em todas as doses ensaiadas.

A análise dos resultados em bactérias multirresistentes demonstra uma tendência de desempenho muito superior à apresentada nas cepas sensíveis. As bactérias gram negativas foram inibidas por pequenas concentrações do peptídeo, inferiores inclusive, às concentrações dos antimicrobianos convencionais, como a polimixina B e o meropenem, que na presença de diferentes mecanismos de resistência representam as únicas opções terapêuticas. Diferentes mecanismos de resistência expressos isoladamente e em associação resultam em resistência a cefalosporinas, aminoglicosídeos, quinolonas e outras classes de antimicrobianos, que seriam alternativa terapêutica no tratamento de infecções por bactérias gram negativas (Tenover,2006; Yamachika *et al*,2012). As infecções por bactérias multirresistentes têm se tornado cada vez mais freqüentes, fazendo da escolha da terapia empírica, um desafio (Orsini,2012).

Nas cepas de *Escherichia coli* produtoras de betalactamses de espectro estendido (ESBL), com o uso de 10µg/mL e 100 µg/mL de polimixina B a taxa de inibição do crescimento foi de 100% e com o uso de 10 µg/mL e 100µg/mL de meropenem, encontrou-se uma taxa de inibição do crescimento de 93% e 98% respectivamente. A mesma taxa de inibição foi encontrada com 1µg/mL do peptídeo. Um estudo realizado por Lin e colaboradores em 2012; obteve resultados muito semelhantes aos desta pesquisa, testando um mastoparano também extraído de vespas, contra cepas de *E.coli* padrão e multirresistentes. O mastoparano testado no referido estudo, apresentou potencial de inibição do crescimento sobre as cepas sensíveis e também as resistentes, com atividade superior à dos fármacos convencionais. Uma ressalva a este estudo entretanto, é que as moléculas convencionais por eles testadas não são as opções de escolha na terapia das infecções por bactérias com os genes de resistência descritos no estudo.

No presente estudo, a escolha das moléculas convencionais foi guiada pela terapia indicada para bactérias multirresistentes, o que permite salientar a comparabilidade do peptídeo ensaiado, com fármacos que representam com grande frequência, a última linha de tratamento. Ainda no estudo de Lin *et al* (2012) foi demonstrada uma atividade sinérgica entre o mastoparano e drogas convencionais, desenvolvendo um tema abordado primeiramente por Cirione e colaboradores em 2008, quando avaliou o sinergismo entre um mastoparano e uma molécula clássica contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados que se apresentam na leitura das tabelas com taxas de inibição superior a 100% possivelmente refletem uma precipitação das partículas sólidas do meio Mueller Hinton, que se depositaram no fundo do poço, levando a uma absorvância inferior ao controle e resultados com porcentagem superior a 100%. Pode-se verificar pequenas partículas de precipitado no fundo dos poços, e apesar de não constar da metodologia, a suspensão destes poços foi semada em ágar sangue, com objetivo de descartar crescimento bacteriano contaminante. Foi feita a incubação por 48 horas em temperatura padrão, e como esperado, não houve crescimento bacteriano.

As ESBL são enzimas mediadas por genes plasmidiais, não induzíveis, capazes de hidrolisar a cadeia oximino-beta-lactâmica presente na estrutura química da droga, o que faz com que seu espectro de ação se estenda aos betalactâmicos de amplo espectro como as cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos, mas não conferem resistência aos carbapenens (Bush, 2001). Estudos recentes descrevem a perda do cefepime para tratamento de cepas de *E.coli* produtoras de ESBL, restando como únicas opções entre o antimicrobianos betalactâmicos, a piperacilina/tazobactam e os carbapenens, classe a qual pertence o meropenem (Parke *et al*, 2012). Como as betalactamases se localizam no espaço periplasmático de gram negativos, alcançando altas concentrações, os antimicrobianos são inativados logo após sua passagem pela membrana externa.

Um provável mecanismo de ação do peptídeo em estudo é a desestabilização da membrana externa bacteriana, provocando o livre fluxo de compostos para dentro e fora da célula, levando à sua lise. Portanto, o mecanismo de produção de enzimas inativadoras, um conhecido mecanismo de resistência, não tem ação sobre esta molécula. Mesmo que o micro-organismo produza altas concentrações de enzimas,

não há afinidade, nem contato com o peptídeo, já que este se concentra na membrana externa, localizada externamente ao espaço periplasmático.

A *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo KPC, também representa um grande desafio no manejo das infecções, assim com as ESBL, as carbapenemases são enzimas que não representam o primeiro ou o único mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, mas são notáveis, porque elas muitas vezes não são detectadas por antibiogramas de rotina e por possuir um potencial excepcional de disseminação. Além dos desafios ao controle de infecções que surgiram, as infecções causadas por estes organismos apresentam desafios clínicos no tratamento de infecções graves, devido à limitação das opções de antibióticos. (Yigit *et al*, 2001). Os resultados encontrados deixam explícita, a potente atividade desta molécula, sendo superior à polimixina B, que neste caso pode representar a única opção de tratamento. A inibição do crescimento bacteriano foi de 100% na concentração de 5µg/mL do peptídeo objeto de estudo, contra uma média 99% em 10µg/mL e 100µg/mL de polimixina. Não foram encontrados relatos na literatura, de testes que avaliem a atividade de novos peptídeos antimicrobianos em cepas produtoras de carbapenemases do tipo KPC. Jiang e colaboradores (2012) relatam testes de um peptídeo antimicrobiano e seus derivados, com atividade contra isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, apresentando MICs que variaram de 0,5µg/mL a 4µg/mL, mas não se referem à presença de mecanismos de resistência nos isolados utilizados no estudo. Ainda neste estudo, encontraram inibição também contra cepas padrão de *K.pneumoniae*, com MIC de 2µg/mL.

*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* Complex são bactérias freqüentemente ambientais, capazes de sobreviver em meios úmidos por longos períodos e com diversificados mecanismos de produção rápida de resistência. A diminuição da permeabilidade da membrana externa pela deleção ou redução da expressão de porinas em combinação com diferentes mecanismos de efluxo de drogas da célula bacteriana e seus mecanismos intrínsecos de resistência, contribuem para o impacto causado por *Pseudomonas* nas infecções relacionadas a assistência. Foram as primeiras espécies a produzir as carbapenemases, principalmente do tipo metalo-betalactamases, que são enzimas capazes de hidrolizar todas as cefalosporinas anti-pseudomonas e os carbapenens. A opção para tratamento das infecções graves por estas bactérias é a polimixina B, mas

atualmente são comuns os relatos de *Pseudomonasaeruginosa* e *Acinetobacter spp* com sensibilidade diminuída ou resistência a este fármaco. (López-Rojaset *al*,2011; Viedmaet *al*,2012). O peptídeo em estudo pode representar uma alternativa no tratamento das infecções por estas bactérias, já que inicialmente são atraídos para as cargas negativas existentes na membrana externa de bactérias gram negativas, culminando em lise celular. Os resultados alcançados nesta pesquisa evidenciaram inibição completa do crescimento bacteriano com concentrações de 1µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* e 5µg/mL para *Acinetobacter baumannii*. Nas mesmas condições de testes, o meropenem, mesmo em concentração de 100 µg/mL , não exerceu atividade inibitória em ambas as bactérias. A polimixina B demonstrou atividade inibitória de *A.calcoaceticcus* variando entre 88, 5 e 98,3 em concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL respectivamente. Em *P.aeruginosa* a inibição deem média de 99% foi obtida em ambas as diluições da droga.

Vários estudos descrevem atividade inibitória de diferentes PAM sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, e poucos estudam *Acinetobacter baumannii*, entretanto nenhum dos estudos demonstrou atividade tão potente quanto a aqui encontrada. Um estudo realizado em 2008 apresentou uma proposta diferente, utilizando testes de terapia combinada entre um PAM alfa helicoidal e rifampicina em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Como os PAM em geral têm influência sobre a permeabilidade da membrana, a tentativa de obter sinergismo com um antimicrobiano convencional, que tenha um sítio específico internamente a esta membrana, pode alcançar resultados promissores. O referido estudo abriu precedente para uma série de testes de combinações sinérgicas entre PAM e antimicrobianos convencionais. Também nestes modelos de estudos, acredita-se que a molécula aqui estudada tenha resultados animadores, já que ficou clara a sua independência de diferentes mecanismos de resistência, sendo mais eficaz contra cepas multirresistentes que contra cepas sensíveis (Cirione *et al*,2008; Jiang *et al*,2012; Wang *et al*,2012). Apesar de poucos estudos utilizando cepas de *Acinetobacter sp*, um estudo de 2012, testou diferentes moléculas de mastoparanos também contra cepas padrão e multirresistentes, e os resultados encontrados são semelhantes aos apresentados por nosso estudo: uma atividade muito mais intensa, de até quatro vezes maior, nas cepas resistentes que nas selvagens, para 3 das 15 moléculas estudadas. No referido estudo, que foi realizado por Farraes *et al*, a

resposta dos mastoparanos foi avaliada em bactérias com perfil de resistência diferente do nosso estudo, já que a expressão de resistência utilizada foi à colistina, ou seja, resistência a polimixina B, à qual as cepas utilizadas em nossos ensaios eram sensíveis. (Farraeset *al*,2012).

No ano de 2002, Vizioli e Salzet, já sugeriam a utilização de novas moléculas extraídas de animais invertebrados, como alternativas ao desafio de tratar as recém emergentes cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina e *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina.

Os resultados dos testes com as bactérias gram positivas foram tão promissores quanto com as gram negativas. Observou-se inibição do crescimento de 100%, com apenas 30 µg/mL do peptídeo, para *Staphylococcus aureus* MRSA e *Enterococcus faecalis* VRE. O antimicrobiano utilizado para comparação foi a vancomicina, mesmo o *Enterococcus faecalis* apresentando resistência conhecida a este fármaco, pois como testamos concentrações muito maiores que as utilizadas na definição de resistência para este conjunto droga/bactéria, definimos como um bom fator de comparação. A vancomicina foi capaz de inibir 95% dos *Staphylococcus aureus* nas concentrações de 10µg/mL e 100µg/mL, enquanto os *Enterococcus faecalis* tiveram uma inibição de somente cerca de 29% em ambas as diluições.

Um estudo realizado no ano de 2007, com extratos brutos de esponjas encontradas no litoral brasileiro, apresentou atividade antimicrobiana em cepas padrão de *Staphylococcus aureus* e também contra cepas clínicas de MRSA, sendo que dos quatro extratos estudados, três se mostraram eficazes contra as cepas padrão, com MICs que variaram entre 170µg/mL e 1250µg/mL; e apenas um se mostrou eficaz contra as cepas multirresistentes, com MIC de 85µg/mL (Kossugaet *al*, 2007). Estes dados são concordantes com os encontrados na presente pesquisa, já que verificou-se uma atividade melhor nas cepas com resistência que nas cepas sensíveis, fato que ressalta a importância do peptídeo em questão.

Um recente trabalho avaliando a atividade antimicrobiana de peptídeos extraídos da pele de rãs descreve atividade inibitória do crescimento de cepas padrão *Staphylococcus aureus*, com MICs muito superiores aos encontrados neste trabalho: variando de 35µg/mL a 42µg/mL, dos dois compostos pesquisados.

Também no referido trabalho, não foi avaliada a atividade em cepas expressando padrões de resistência (Azodehet al, 2012).

O peptídeoglicano, que proporciona rigidez e estabilidade funcional à célula bacteriana, é formado por filamentos alternados de aminoaçúcares, em ligação cruzada pelos peptídeos. A camada de peptídeoglicano das bactérias gram positivas é uma camada espessa, externa à membrana celular única. A biossíntese do peptídeoglicano consiste em diversas etapas que começam no citoplasma e terminam fora da membrana celular. É neste processo de biossíntese, que os antimicrobianos betalactâmicos encontram seus alvos. O mais importante mecanismo de resistência em gram positivos, principalmente os estafilococos, é a alteração nas proteínas ligadoras de penicilina, impedindo o acesso à cadeia de peptídeoglicano em crescimento. Também nestas cepas, o peptídeo utilizado em nossa pesquisa consegue um desempenho melhor, pois como não depende de ligação específica a sítios alvo que possam sofrer mutações, consegue exercer sua atividade de quebra da integridade da membrana, sem sofrer interferência por alterações estruturais.

As cepas de *Staphylococcus aureus* têm um potencial de virulência maior que a das bactérias gram negativas e de muitos outros gram positivos, originando infecções com resposta inflamatória local intensa, e tendência a evolução para bacteremia devido ao seu poder de invasão tecidual, com potencial capacidade de progressão para choque séptico (Rybacet al, 2011). Existem relatos de cepas multirresistentes que se originaram na comunidade, acometem indivíduos hígidos e têm alta virulência. O surgimento de moléculas com capacidade de agir de forma eficaz sobre estas cepas pode representar a possibilidade terapêutica, com potencial sucesso para impedir o agravamento do quadro clínico.

Todos os dados resultantes desta pesquisa evidenciam a eficácia desta nova molécula na inibição do crescimento de bactérias gram positivas e gram negativas, a comparação destes resultados com resultados de diferentes estudos, com os mais variados tipos de peptídeos, comprova a superioridade do seu desempenho *in vitro*.

## 6. Conclusão

Neste trabalho, estudamos uma nova molécula, isolada a partir da peçonha de vespas sociais encontradas no cerrado brasileiro, na região de Brasília, Distrito Federal. Isolamos um peptídeo de pequeno tamanho, de cadeia linear, que demonstrou potente atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e gram negativas. O peptídeo descrito nesta pesquisa, apresenta atividade contra bactérias padrão, conhecidamente sensíveis, não portadoras de genes de resistência, e também sobre cepas multirresistentes. A capacidade de inibição do crescimento bacteriano foi maior e mais potente nas cepas com expressão de elaborados mecanismos de resistência, o que representa uma grande promessa para pesquisas futuras, sobre sua introdução como alternativa terapêutica, com potenciais chances de sucesso.

A atividade antibacteriana foi obtida com baixas concentrações da molécula em estudo, mostrando-se muito melhor que as moléculas de antimicrobianos tradicionais.

A molécula aqui estudada comprova que o estudo dos peptídeos antimicrobianos pode levar à descoberta de moléculas inéditas, para as quais não existe resistência conhecida, com capacidade de atuar de forma rápida e eficaz sobre as bactérias que têm causado altos índices de morbi-mortalidade nos pacientes com processos infecciosos.

## 7. Referências

ALOUSH, V.; *et al.* Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Vol. 50, n° 1, p. 43-48, 2006.

AMBLER, R. P. The structure of  $\beta$ -lactamases. **Philosophical Transactions of The Royal Society B. Biological Science**. Vol. 289, n° 1036, p. 321-331, 1980.

ANDRADE, D.; ANGERAMI, E.L.S. Reflexões acerca das infecções hospitalares às portas do terceiro milênio. **Medicina, Ribeirão Preto**. Vol. 32, p.492-497, 1999.

ANDRADE, D.;LEOPOLDO, V. C.; HAAS, V. J. Ocorrência de bactérias multiresistentes em um centro de Terapia Intensiva de Hospital brasileiro de emergências. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**. Vol. 18, n° 1, p. 27-33, 2006.

ARJONA, A. Innate immune control of West Nile virus infection. **Cellular Microbiology**. Vol. 13, n° 11, p. 1648-1658, 2011.

ASOODEH, A.; ZARDINI, H. Z.; CHAMANI, J. Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides, temporin-Ra and temporin-Rb, from skin secretions of the marsh frog (*Rana ridibunda*). **Journal of Peptide Science**. Vol. 18, n° 1, p.10-16, 2012.

BOMAN, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annual Review of Immunology**. Vol.13, p. 61-92, 1995.

BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. **Cell**. Vol. 65, n° 2, p. 205-207, 1991.

BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**. Vol. 254, n° 3, p. 197-215, 2003.

BOMBERGER, J. M. *et al.* Long-Distance Delivery of Bacterial Virulence Factors by *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Vesicles. **PLoS Pathogens**. Vol. 5, n° 4, p. 1-13, 2009.

BOUCHER, H. W. *et al.* Bad Bugs. No Drugs: no ESKAPE! an update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 48, n°1, p.1-12, 2009.

BRASIL, Ministério da saúde. Portaria 2616/98. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/portaria2616.html>. Acesso em 26/01/2012.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Controle e Investigação de Bactérias Multirresistentes. Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos (Gipea). Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde (GGTES). Maio, 2007.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas para Identificação, Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde por Micro-organismos Multirresistentes. Nota Técnica, n. 1/2010, 9 p; 2010.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica 1/2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/produtossaude>. Acesso em: 26/01/2011

BROGDEN, K. A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? **Nature**. Vol. 3, p. 238-250, 2005.

BROWER J; Chalk P. The global threat of new and emerging infectious diseases: Reconciling U.S. national security and public health policy. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 9, n° 9, p. 1189-1190, 2003.

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion of Immunology**. Vol. 18, n° 1, p. 24-30, 2006.

BULET, P. et al. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental & Comparative Immunology**. Vol. 23, n° 4-5, p. 329-344, 1999.

BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**. Vol. 198, n° 1, p. 169-184, 2004.

BUSH, K; JACOBY, G; A; MEDEIROS, A; A. A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vol. 39, n° 6, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 32, n° 7, p. 1085-1089, 2001.

BUSH, K. Review: The Role of  $\beta$ -Lactamases in Antibiotic-resistant Gram-negative Infections. **Bush Critical Care**. Vol. 14, n° 224, p. 1-8, 2010.

CAI, J. et al. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates Possessing the Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase KPC-2 in Intensive Care Units of a Chinese Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Vol. 52, n° 6, p. 2014-2018, 2008.

CALFEE, D.; JENKINS, S. G. Use of Active Surveillance Cultures to Detect Asymptomatic Colonization With Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Intensive Care Unit Patients. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. Vol. 29, n° 10, p. 966-968, 2008.

CEDRIC, M. et al. Microbiologia Médica. **Elsevier**, Rio de Janeiro, 2005.

CEPEDA, J. A. et al. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two-centre study. **Lancet**. Vol. 365, n° 9456, p. 295-304, 2005.

CHAMBERS, H.F. Community-associated MRSA—resistance and virulence converge. **The New England Journal of Medicine**. Vol. 352, p. 1485-1487, 2005.

CIRIONE, O et al. Protective effects of the combination of a-helical antimicrobial peptides and rifampicin in three rat models of *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Vol. 62, n° 6, p. 1332-1338, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. **Document M100-S22**. CLSI, Wayne, PA; 2012.

CODY, W. L. et al. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR Controls Cyanide Production in an AlgZ-Dependent Manner. **Journal of Bacteriology**. Vol. 191, n° 9, p. 2993-3002, 2009.

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**. Vol. 257, n° 5073, p. 1050-1055, 1992.

COOPER, M. A.; SHALES, D. Fix the antibiotics pipeline. **Nature**. Vol. 472, n° 7341, p. 32, 2011.

COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Eurosurveillance**. Vol. 13, n° 47, p. 1-11, 2008.

CORDEIRO, R., P. **Estudo de perfil de sensibilidade/resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA do Hospital das Clínicas de Pernambuco**. Recife. UFPE. 2004. Dissertação (Mestrado) Programa de pos graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2004.

COSTERTON, J. W.; INGRAM, J. M.; CHENG, K. J. Structure and Function of the Cell Envelope of Gram-Negative Bacteria. **Bacteriology Reviews**. Vol. 38, n° 1, p. 87-110, 1974.

DELISLE, S.; PERL, T. M. Vancomycin-resistant *enterococci*: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. **Chest**. Vol. 123, P. 504-518, 2003.

DIENSTMANN, R. et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**. Vol. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.

DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**. Vol. 5, p. 939-951, 2007.

DURR, M.; PESCHEL, A. Chemokines Meet Defensins: the Merging Concepts of Chemoattractants and Antimicrobial Peptides in Host Defense. **Infection and Immunity**. Vol. 70, n° 12, p. 6515-6517, 2002.

ERRIDGE, C. et al. *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. **Journal of Medical Microbiology**. Vol. 56, n° 2, 165-171, 2007.

FARRAES, X. V. et al. In vitro activity of several antimicrobial peptides against colistin susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Microbiology and Infection**. Vol. 18, n° 4, p. 383-387, 2012.

FORTALEZA, C. R.; MELO, E. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Colonização nasal por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e mortalidade em pacientes de uma unidade de terapia intensiva. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. Vol. 17, n° 5, p. 1-6, 2009.

FURTADO, G. H. C. et al. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. Vol. 39, n° 1, p. 41-46, 2005.

FRIDKIN, S. K.; GAYNES, R. P. Antimicrobial resistance in intensive care units. **Clinics in Chest Medicine**. Vol. 20, n° 2, p. 303-316, 1999.

GANZ, T. The Role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity. **Integrative & Comparative Biology**. Vol. 43, n° 2, p. 300-304, 2003.

GENTZ, M. C. et al. Comparison Of The Peptidome And Insecticidal Activity Of Venom From A Taxonomically Diverse Group Of Theraphosid Spiders. **Toxicon**. Vol. 53, n° 5, p. 496-502, 2009.

GILBERT, D. N. et al. The 10 \_ '20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 50, n° 8, p. 1081-1083, 2010.

GILLIGAN, P. H. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**. Vol. 4, n° 1, p. 35-51, 1991.

GIRALT, E. et al. Design, synthesis and structure of peptides and proteins. IRB Barcelona (Institute for Research in Biomedicine) Annual Report 2005-2006. **Chemistry and Molecular Pharmacology Programme**.

GOLD, H. S.; MOELLERING, R. C. Jr. Antimicrobial-Drug Resistance. **The New England Journal of Medicine**. Vol. 335, n° 19, p. 1445-1453, 1996.

GORDON, N. C.; WARECHAM, D. W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Vol. 35, n° 3, p. 219-226, 2010.

GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; OLSEN, J. E. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. **Journal of Applied Microbiology**. Vol. 87, n° 5, p. 659–667, 1999.

GUPTA, N. et al. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and Prevention. **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 53, n°1, p. 60-67, 2011.

GUZMAN-BLANCO, M. et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Vol. 34, n° 4, p. 304-308, 2009.

HABERMANN, E. Bee and wasp venoms. **Science**, Vol. 177, n° 46, p. 314-322, 1972.

HANCOCK, R. E. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 27, p. 93-99, 1998.

HANCOCK, R. E.; BRINKMAN, F. S. Function Of *Pseudomonas* Porins In Uptake and Efflux. **Annual of Review Microbiology**. Vol. 56, p. 17-38, 2002.

HARBATH, S.; SAMORE, M. H. Antimicrobial resistance determinants and future control. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 11, n° 6, 794-801, 2005.

HAWLEY, J. S.; MURRAY, C. K.; JORGENSEN, J. H. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Vol. 52, n° 1, p. 351-352, 2008.

HAWKEY, P.M. The Origins and Molecular Basis Of Antibiotic Resistance. **BMJ**. Vol. 317, n° 7159, p. 657-660, 1998.

HERMOS, C. R.; YOONG, P.; PIER, G. B. High Levels of Antibody to Panton-Valentine Leukocidin Are Not Associated with Resistance to *Staphylococcus aureus*-Associated Skin and Soft-Tissue Infection. **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 51, n° 10, p. 1138-1146, 2010.

HOFFMANN, J. A. et al. Phylogentic Perspectives In Innate Immunity. **Science**. Vol. 284, n° 5418, p. 1313-1318, 1999.

HOGGARD, S. J. et al. Social Complexity and Nesting Habits Are Factors in the Evolution of Antimicrobial Defences in Wasps. **PLoS ONE**. Vol. 6, n° 7, p. 1-5, 2011.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert Rev Pharmacoecon Outcomes**. Vol. 10, n° 4, p. 441-451, 2010.

HOUSMAN, S. T.; SUTHERLAND, C.; NICOLAU, D. P. *In Vitro* Evaluation Of Novel Compounds Against Selected Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Vol. 56, n° 3, p. 1646-1649, 2012.

IDSA: Infection Disease Of Society American: Identification And Characterization Of Porins In *Pseudomonas aeruginosa*. Report: Bad Bugs, No Drugs: As Antibiotic Discovery Stagnates, a Public Health Crisis Brews; July 2004 Disponível em: <http://www.idsociety.org/10x20.htm>; Acesso em 26/01/2011.

JIANG, H. J. et al. The Design and Construction of K11: A Novel  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptid. **International Journal of Microbiology**.Vol. 2012, p. 1-6, 2012.

JILL, C. R. et al. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemic Clone USA300 in Isolates from Florida and Washington. **Journal of Clinical Microbiology**.Vol. 44, n° 1, p. 225-226, 2006.

JIMENEZ, GMS; HERNANDEZ, AB; BRAUER, JME.Bioactive Peptides and Depsipeptides with Anticancer Potential: Sources from Marine Animals. **Marine Drugs**.Vol. 10, p. 963-986, 2012.

JOHNSTON, C. P. et al. *Staphylococcus aureus* Colonization Among Healthcare Workers at a Tertiary Care Hospital. **Infection control and hospital epidemiology**.Vol. 28, n° 12, p. 1404-1407, 2007.

JONES, T. F. et al. An Outbreak of Community-Acquired Foodborne Illness Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**.Vol. 8, n° 1, 2002.

KOCK, R. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA): Burden Of Disease And Control Challenges In Europe.**Eurosurveillance**. Vol. 15, n° 41, p. 1-9, 2010.

KONEMAN, Diagnóstico Microbiológico: texto e Atlas colorido; Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 6ªEd, 2008.

KONG, F. K. et al. Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology.**APMIS**.Vol. 118, n° 1, p. 1-36, 2010.

KOSSUGA, M. H. et al. Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas monanchora arbuscula, aplysina sp. petromica ciocalyptoides e topsentia ophiraphidites, da ascídia didemnum ligulum e do octocoral carijoa riisei. **Química Nova**. Vol 30, n° 5, p. 1194-1202, 2007.

LAUTENBACH, E. et al. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors for Infection and Impact of Resistance on Outcomes.**Clinical Infectious Diseases**. Vol. 32, n° 8, p. 1162-1171, 2001.

LEE, H. W. et al. Capacity of multidrugresistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection**.Vol.14, n° 1, p. 49-54, 2008.

LIN, C. H. et al. In vitro activity of mastoparan-AF alone and in combination with clinically used antibiotics against multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from Animals. **Peptides**. Vol. 36, n° 1, p. 114-120, 2012.

LIU, C. et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infections in Adults and Children. **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 52, n° 3, p. 18-55, 2011.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 34, n° 5, p. 634-640, 2002.

LIVERMORE, D. M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 36, n° 1, p.11-23, 2003.

LOPES, H. V. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. **Rev Panam Infectol**. Vol. 7, n° 3, p. 34-36, 2005.

LOPEZ-ROJAS, R. et al. Impaired Virulence and In Vivo Fitness of Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **The Journal of Infectious Diseases**. Vol. 203, n° 4, p. 545-548, 2011.

LORIAN, J. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore, EUA: Ed. William & Wilkin, 1996.

MACHADO, A. et al. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**. Vol. 27, n° 5, p. 781-789, 2004.

MALOY, W. L.; KARI, U. P. Structure–activity studies on magainins and other host defense peptides. **Biopolymers**. Vol. 37, n° 2, p. 105–122, 1995.

MAHAJAN, S. N. et al. Characteristics and Outcomes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections in Patients with Cancer Treated with Vancomycin: 9-Year Experience at a Comprehensive Cancer Center. **The Oncologist**. Vol. 17, n° 10, p. 1329-1336, 2012.

MARCOTTE, I. et al. Interaction of antimicrobial peptides from Australian amphibians with lipid membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**. Vol. 122, n° 1-2, p. 107-120, 2003.

MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. Antibacterial Peptides for Therapeutic Use: Obstacle and realistic outlook. **Current Opinion in Pharmacology**. Vol 6, n° 5, p. 468-472, 2006.

MARTINS, S. T. et al. Application of control measures for infections caused by multi-resistant gram-negative bacteria in intensive care unit patients. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol.99, n° 3, p. 331-334, 2004.

MATSUZAKI, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. **Biochimica et Biophysica Acta**. Vol.1376, n° 3, p.391-400, 1998.

MCADAMS, R. M. et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 in a neonatal intensive care unit. **Pediatrics International**, Vol. 50, n° 6, p810-815, 2008.

MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). **Toxicon**, Vol. 45, n° 1, p. 101-106, 2005.

MENEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**.Vol. 39, n° 2, p. 147-150, 2007.

MERIC, M. et al. Emergence and spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Turkey. **FEMS Microbiology Letters**.Vol. 282, n° 5, p. 214-218, 2008.

MESAROS, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology and Infection**.Vol. 13, n° 6, p. 560-578, 2007.

MILLER, L. G. et al. Necrotizing Fasciitis Caused By Community-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* In Los Angeles.**The New England Journal of Medicine**.Vol. 352, p. 1445–1453, 2005.

MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.Vol, 43, n° 4, p. 727-737, 1999.

MOFFATT, J. H. et al. Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii*s Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.Vol. 54, n° 12, p. 4971-77, 2010.

MONTEIRO, J; SANTOS, A. F. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.Vol. 53, n° 1, p. 333-334, 2009.

MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R.; SOARES, A. M. Pharmacological perspectives of wasp venom.**Protein and Peptide Letters**.Vol. 16, n° 8, p. 944-952, 2009.

MORTARI, M. R. et al. Comparative toxic effects of the venoms from three wasp species of the genus *Polybia* (Hymenoptera, Vespidae).**Journal of Biological Sciences**.Vol. 5, n° 4, p. 449-454, 2005.

MORTARI, M. R. et al. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: from basic research to therapeutic application. **Pharmacology & Therapeutics**.Vol. 114, n° 2, p. 171-183, 2007.

MORTARI, M. R. et al. Pharmacological characterization of *Synoeca cynea* venom: Na aggressive social wasp widely distributed in the Neotropical region. **Toxicon**.Vol. 59, n° 1, p. 163-170, 2012.

MULLARD, A. Immune Evasion: Overcoming Defensins. **Nature Reviews Microbiology**.Vol. 6, p. 415, 2008.

NAKAJIMA, T. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In: Venoms of the Hymenoptera (Piek, T., Ed.) New York: Academic Press, p. 309-327, 1986.

NIKAIDO, H. Outer Membrane Barrier as a Mechanism of Antimicrobial Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.Vol. 33, n° 11, p. 1831-1836, 1989.

NIKAIDO, H.; NIKAIIDO, K.; HARAYAMA, S. Identification and Characterization of Porins in *Pseudomonas aeruginosa*.**The Journal of Biological Chemistry**.Vol. 15, n° 266, p. 770-779, 1991.

NORDMANN, P. et al. Superbugs In The Coming New Decade; Multidrug Resistance And Prospects For Treatment Of *Staphylococcus aureus*,*Enterococcus spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. **Current Opinion in Microbiology**.Vol 10, n° 5, p. 436-440, 2007.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NASS, T.The real Threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria.**The Lancet Infectious Diseases**.Vol. 9, n° 4, p. 228-236, 2009.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*.**Emerging Infectious Diseases**.Vol, 17, n° 10, p. 1791-1798, 2011.

NTWASA, M.; GOTO, A.; KURATA, S. Coleopteran Antimicrobial Peptides: Prospects for Clinical Applications. **International Journal of Microbiology**.Vol. 2012, p. 1-8, 2012.

OJENIYI, B.; BAEK, L.; HOIBY, N. Polyagglutinability due to loss of O-antigenic determinants in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica**.Vol. 93, n° 1, p. 7-13, 1985.

WARRELL, David A; Timothy M Cox, Jonh D Firth. Oxford Textbook Of Medicine Fifty Edition StaphylococciOTM (2012) 5(1): med-9780199204854-chapter disponível em:  
<http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199204854.001.1/med-780199204854-chapter-070604>> acesso em : 09/12/2012.

ORSINI, J. et al. Microbiological profile of organisms causing bloodstream infection in critically ill patients. **Jounal of Clinical Medicine Research**.Vol. 4, n° 6, 371-377, 2012.

OTERO-GONZÁLEZ, A. J. et al. Antimicrobial Peptides From Marine Invertebrates As A New Frontier For Microbial Infection. **FASEB Journal**. Vol. 24, n° 5, p. 1320-1334, 2010.

PARK, Y. S. et al. Clinical and Microbiologic Characteristics of Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* at Three Centers in the United States. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Vol. 56, n° 4, p. 1870-1876, 2012.

PESCHEL, A.; SAHL, H. G. The Co-Evolution Of Host Cationic Antimicrobial Peptides And Microbial Resistance. **Nature Reviews Microbiology**. Vol. 4, p. 529-536, 2006.

PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules Or Future Drugs? **PLoS Pathog**. Vol. 6, n° 10, p. 1-4, 2010.

PILONETTO, M. et al. Hospital Gowns As A Vehicle For Bacterial Dissemination In An Intensive Care Unit. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. Vol. 8, n° 3, p. 206-210, 2004.

PITTET, D. Infection control and quality health care in the new millennium. **American Journal of Infection Control**. Vol. 33, n° 5, p. 258-267, 2005.

POLOTTO, M. et al. Detection Of *P.aeruginosa* Harboring Blactx-M-2, Blages-1 And Blages-5, Blaimp-1 And Blaspm-1 Causing Infections In Brazilian Tertiary-Care Hospital. **BMC Infectious Diseases**. Vol. 12, n° 176, p. 1-8, 2012.

POLLACK M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5<sup>th</sup> ed. New York, NY: Churchill Livingstone; p. 2310-2317, 2000.

PUJALS, S. et al. Mechanistic aspects of CPP mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly. **Biochimica et Biophysica Acta**. Vol. 1758, n° 3, p. 264-279, 2006.

QUALLS, M. L. et al. Emergency Department Visit Rates for Abscess Versus Other Skin Infections During the Emergence of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, 1997-2007. **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 55, n° 1, p. 103-105, 2012.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. Vol. 20, n° 3, p. 440-458, 2007.

RANGEL, M. et al. Chemical and biological characterization of four new linear cationic  $\alpha$ -helical peptides from the venoms of two solitary eumenine wasps. **Toxicon**. Vol. 57, n° 7-8, p. 1081-1092, 2011.

RASMUSSEN, J. W.; HOIBY, N. Class A Carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Vol. 60, p. 470-482, 2007.

RESHMY, V. et al. Three novel antimicrobial peptides from the skin of the Indian bronzed frog *Hylarana temporalis* (Anura: Ranidae). **Journal of Peptide Science**. Vol. 17, n° 5, p. 342–347, 2011.

RICE, L. B. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. **The American Journal of medicine**. Vol. 34, n° 5, p. 11-19, 2006.

ROBERTS, J. C. et al. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemic Clone USA300 in Isolates from Florida and Washington. **Journal of clinical microbiology**. Vol. 44, n° 1, p. 225–226, 2006.

RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; SEAS, C. The Changing Pattern Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* clones In Latin America: Implications For Clinical Practice In The Region. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. Vol. 14, n° 2, p. 87-96, 2010.

RUSSELL, A. D.; CHOPRA, I. Understanding antibacterial action and resistance, 1st ed. Ellis Horwood, London, 1990.

RYBAK, W. B. et al. Activity of Antimicrobial Peptides and Conventional Antibiotics against Superantigen Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from the Patients with Neoplastic and Inflammatory Erythrodermia. **Chemotherapy Research and Practice**. Vol. 2011, p. 1-6, 2011.

SADER, H. S. et al. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First Case in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**. Vol. 2, n° 3, p. 160-163, 1998.

SADER, H. S. Antimicrobial Resistance in Brazil: Comparison of Results from Two Multicenter Studies. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**. Vol. 4, n° 2, p. 91-99, 2000.

SANG, Y.; BLECHA, F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. **Animal Health Research Reviews**. Vol. 9, n° 2, p. 227-235, 2008.

SARAIVA, I. H. et al. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de 87 amostras clínicas de enterococos resistentes à vancomicina. **Revista Ass Med Brasil**. Vol. 43, n° 3, p. 214-222, 1997.

SILVA, C., H., M., et al. Bacteriologia e Micologia para o laboratório clínico. Primeira edição, Editora Revinter, capítulos 12 e 26, São Paulo – SP, 2006.

SLAMA, T. G. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. **Critical Care**. Vol. 12, n° 4, p. 1-4, 2008.

STOW, A. et al. Antimicrobial defences increase with sociality in bees. **Biology Letters**. Vol. 3, n° 4, 422-424, 2007.

SAMPATHKUMAR et al. Structure of a putative BenF-like porin from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 at 2.6 Å resolution. 2008. Published online 23 July 2010 in Wiley

Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/prot.22829. Acesso em 20/02/2013.

SENGSTOCK, D. M. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging pathogen among older adults in community hospitals and nursing homes. **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 50, n° 12, p; 1611-1616, 2010.

SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**. Vol. 4, n° 10, p. 215-224, 2002.

SHU, J. C. et al. Interplay between mutational and horizontally acquired resistance mechanisms and its association with carbapenem resistance amongst extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (XDR-PA). **International Journal of Antimicrobial Agents**. Vol. 39, n° 3, 217-222, 2012.

SKARNES, R. C.; WATSON, D. W. Antimicrobial Factors of Normal Tissues and Fluids. **Antimicrobial Tissue Factors**. Vol. 21, n° 4, p. 273-294, 1957.

SPERANDIO, B. et al. Virulent *Shigella flexneri* subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. **The Journal of Experimental Medicine**. Vol. 205, n° 5, p. 1121-1132, 2008.

STUART, J. C. et al. Guideline for Phenotypic Screening and Confirmation of Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Vol. 36, n° 3, p. 205-210, 2010.

TENOVER, F.C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**. Vol. 119, n° 6, p.3–10, 2006.

TITZE-de ALMEIDA *et al.* Molecular Epidemiology and Antimicrobial Susceptibility of Enterococci Recovered from Brazilian Intensive Care Units. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. Vol. 8, n° 3, p. 197-205, 2004.

TOMASZ, A. et al. New Mechanism for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: Clinical Isolates That Lack the PBP 2a Gene and Contain Normal Penicillin-Binding Proteins with Modified Penicillin-Binding Capacity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. Vol. 33, n° 11, p. 1869-1874, 1989.

TRABULSI, L., R., *et al.* Microbiologia. Terceira edição, Editora Atheneu, Biblioteca Biomédica, Capítulo 18. São Paulo, 2002.

Tuennemann *et al* Cell-penetrating peptides – uptake, toxicity, and applications. **IUL Biotechnology Series** (Membrane active peptides), p. 9-329, 2010.

VIEDMA, E. et al. VIM-2-Producing Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 Clone, Spain. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 18, n° 8, p. 1235-1241, 2012.

VINCENT, J. L. Nosocomial Infections In Adult Intensive-Care Units. **The Lancet**. Vol. 361, n° .9374, p. 2068-2077, 2003.

VIZIOLI, J.; SALZET, M. Antimicrobial Peptides From Animals: Focus On Invertebrates. **TRENDS in Pharmacological Sciences**. Vol. 23, n° 11, 2002.

VOLK W, Benjamin D, Kadner R, Parsons Jt. Essentials Of Medical Microbiology. 4 ed. Grand Rapids, J. B. Lippincott, 1991.

VONBERG, R. P. et al. How Often Do Asymptomatic Healthcare Workers Cause Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* Outbreaks? A Systematic Evaluation. **Infection control and hospital epidemiology**. Vol. 27, n° 10, p. 1123-1127, 2006.

VRANJAC, A. Nota Técnica - Enterococo resistente à vancomicina (ERV ou VRE). Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD, Centro de Vigilância Epidemiológica, São Paulo, 2006.

WALSH, T. R. et al. Metallo-B-Lactamases: The Quiet Before The Storm? **Clinical Microbiology Reviews**. Vol. 1, n° 2, p. 306-325, 2005.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research**. Vol. 37, p. 933-937, 2009.

WANG, G. Antimicrobial Peptides. 2011 Stylus Pub LLC. 1ª edição.

WANG, K. et al. Membrane-Active Action Mode of Polybia-CP, a Novel Antimicrobial Peptide Isolated from the Venom of Polybia paulista. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Vol. 56, n° 6, p. 3318-3323, 2012.

WANG, H. et al. Identification and characterization of antimicrobial peptides from skin of *Amolops ricketti* (Anura: Ranidae). **Peptides**. Vol. 33, n° 1, p. 27-34, 2012.

WANG, L. et al. Multidrug-Resistant Clones Of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated From Chinese Children And The Resistance Genes To Clindamycin And Mupirocin. **Journal of Medical Microbiology**. Vol. 61, n° 9, p. 1240-1247, 2012.

WEBER, C., J. Update on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Urologic nursing**, Vol. 28, n° 2, abril, 2008.

YAMACHIKA, S. et al. Correlation between PBP2 mutations and carbapenem-resistance in *E. coli*. **Journal of Medical Microbiology**. Vol. 62, n° 3, p. 429-436, 2013.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacology reviews**. Vol. 55, n° 1, p. 27-55, 2003.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Vol. 45, n° 4, p. 1151-1161, 2001.

Xu P.; SHI, M.; CHEN, X. X. Antimicrobial Peptide Evolution in the Asiatic Honey Bee *Apis cerana*. **PLoS ONE**. Vol. 4, n° 1, p. 1-9, 2009.

ZARRILLI, R. et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. **Journal of Infection in Developing Countries**. Vol. 3, n° 5, p. 335-341, 2009.

ZASLOFF, M. Antimicrobial Peptides Of Multicellular Organisms. **Nature**. Vol 415, n° 6870, p. 389-395, 2002.

ZHAO, H. et al. A Defensin-Like Antimicrobial Peptide From The Venoms Of Spider, *Ornithoctonus Hainana*. **Journal of Peptide Science**. Vol. 17, n° 7, p. 540-544, 2011.

ZILBERBERG, M. et al. Imipenem Resistance Of *Pseudomonas* In Pneumonia: A Systematic Literature Review. **BMC Pulmonary Medicine**. Vol. 10, p. 45, 2010.

MENDES, M. A.; Souza, B. M.; Marques, M. R.; Palma, M. S. Structural and biological of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, Elmsford, 44:67-74, 2004.

KONNO, K.; Hisada, M.; Naoki, H.; Itagi, Y; *et al.* Structure and biological activities of eumenine mastoparan – AF (EMP-AF), a new mast cell degranulation peptide in venom of solitary wasp (*Antenynchium flavomarginatum micado*). **Toxicon**, Elmsford, 38:505-1515, 2000.

HIGASHIMA, M.; Sawada, S.; Yamamoto, C. Applicability of Pascal distribution to quantal analysis for non-stationary release of neurotransmitter. **Neurosci Lett**. 1990 Jul 31;115(2-3):231-6