



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

GILSELENA KERBAUY LOPES

**ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITO SECUNDÁRIO
PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM *Klebsiella
pneumoniae* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE**

GILSELENA KERBAUY LOPES

**ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITO SECUNDÁRIO
PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM *Klebsiella
pneumoniae* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L864a Lopes, Gilselena Kerbauly.
Atividade antibiótica de metabólito secundário produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase / Gilselena Kerbauly Lopes. – Londrina, 2013.
80 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.
Coorientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.
Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2013.
Inclui bibliografia.

1. *Pseudomonas aeruginosa* – Teses. 2. Agentes anti-infecciosos – Teses. 3. Resistência microbiana – Teses. 4. Infecção hospitalar – Teses. 5. Microbiologia – Teses. I. Andrade Filho, Galdino. II. Ogatta, Sueli Fumie Yamada. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579.841.1

GILSELENA KERBAUY LOPES

**ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITO SECUNDÁRIO
PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM *Klebsiella
pneumoniae* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli Fumie Yamada
Ogatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof^a. Dr^a Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de dezembro de 2013.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia Microbiana do Departamento de Microbiologia e no Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina e contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, aos meus anjos da guarda, aos espíritos amigos que me acompanham e me protegem.

Ao meu esposo, **Galdino**, por seu companheirismo e apoio em todos os momentos desse doutorado e da nossa vida. Seu amor me faz forte. Este é um dos muitos sonhos que realizaremos juntos.

Aos meus pais, **Dinho** e **Gilvana** pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos da minha vida. Por serem sempre exemplos de amor, ética, e dedicação. Por me ensinarem a sonhar e a realizar os meus sonhos, entre eles, este doutorado.

A minha avó, **Leilah**, por acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos da minha formação profissional.

Ao meu irmão, **Gabriel**, e minha cunhada e amiga, **Marcela**, pela motivação ao longo de todo doutorado e pelos momentos felizes ao lado das minhas sobrinhas **Julia**, **Maria Eduarda** e **Helena**.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Galdino Andrade**, por todo apoio na realização deste trabalho. Agradeço todos os ensinamentos, que foram além da microbiologia. Foi uma honra trabalhar ao lado de um profissional que tanto admiro. Seu profissionalismo e sua competência me inspiram.

A minha co-orientadora, **Prof^a. Dr^a. Sueli Fumie Yamada-Ogatta**, por acreditar em minhas potencialidades, mesmo sabendo o quão difícil seria inserir uma enfermeira em um laboratório de biologia molecular. Obrigada pela paciência, pela dedicação e tudo o que me ensinou. Você se tornou um grande exemplo na minha vida, exemplo de pesquisadora, professora, mãe e mulher.

Ao **Prof. Dr. Admilton Oliveira Junior**, por participar de todas as etapas deste doutorado com contribuições fundamentais a realização dos experimentos. Obrigada pela paciência, incansável disposição e por todos os ensinamentos.

A **Prof^a. Dr^a. Eliana Carolina Vespero**, por estar sempre disponível a me ajudar, por todo apoio e orientação no transcorrer do doutorado. Pelas enriquecedoras sugestões na qualificação. Obrigada pela sua amizade e carinho.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Morey**, pela sua rica contribuição no trabalho. Sua ajuda foi essencial em todas as etapas deste doutorado.

A técnica de laboratório, **Marta Salvador**, que sempre esteve disponível para ajudar.

Ao **Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello** por permitir a utilização de equipamentos e instalações de seu laboratório.

A equipe do laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário, **Marcilene**, **Floristher**, **Regina**, **Néia**, **Fábio**, **Jerusa**, **Ivone**, e a doutoranda **Carolina Pollano** por gentilmente ceder as cepas que utilizei neste trabalho.

A equipe do Laboratório de Microscopia, **Prof^a. Dr^a. Célia Gadalupe Tardelli de Jesus Andrade** e técnicos, **Daiane Moreira Barbieri** e **Oswaldo Capelo**, pela disposição em todos os horários, pela paciência na busca pela melhor imagem e pelo excelente trabalho realizado.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana **Ane, Bárbara, Carolina Polano, Carolina Martins, Deise, Flávia, Glenda, Juliana, Luana, Marcelo, Mayara, Miguel, Vanessa** e a amiga **Viviana**, pela agradável convivência, pelos ensinamentos, paciência e companheirismo, e especial agradecimento ao **Cleverson** pelas contribuições diretas nos experimentos

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, **Profª. Drª. Lucy, Caio, Carline, Caroline, Cesar, Danielle, Eliane, Eliandro, Igor, Jakson, Jussevânia, Letícia, Ludimila, Marina, Pollyana, Priscila, Renata, Suelen e Thaisa**. Foi uma alegria e um grande aprendizado trabalhar com vocês. Obrigada pela paciência e atenção.

A equipe da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Universitário, **Enfª. Renata, Drª. Cláudia, Drª. Jaqueline, Drª. Josiane, Neuza, Nick e Regina** por todos esses anos de apoio e parceria.

Ao **Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade** pelo excelente trabalho na edição das figuras

As minhas amigas e companheiras de trabalho, docentes da área de Doenças Transmissíveis do Departamento de Enfermagem da UEL, **Denise, Elaine, Elma, Flávia, Gabriela e Zeneide**. O apoio que recebi de vocês, em todos os momentos do meu doutorado e da minha vida pessoal me fizeram admira-las ainda mais. Obrigada pela valiosa amizade.

A amiga **Rita Simões**, minha companheira de quarto no primeiro ano de faculdade. Você fez toda diferença em minha vida quando me apresentou a microbiologia e disse que seria possível.

A amiga **Renata Belei**, obrigada por me acolher na Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Universitário e me ensinar muito do que sei sobre o controle das infecções. Você é meu grande exemplo de competência, dedicação e profissionalismo. Sinto-me privilegiada por te-la em minha vida profissional e pessoal.

A amiga **Márcia Perugini**, por ter confiado e acreditado em mim, abrindo as portas do meu mestrado. Por todos os ensinamentos. Minha amiga e parceira, vamos trabalhar muito juntas!

A amiga **Edilaine**, por ter me apoiado ainda na graduação e publicado ao meu lado o primeiro artigo científico do meu currículo. Obrigada pelo seu carinho, sua parceria e sua amizade.

A chefe do Departamento de Enfermagem da UEL, **Profª. Drª. Julia Martins Trevisan**, que apoiou desde o início a idéia do meu doutorado, tornando possível sua concretização.

As colegas de trabalho da área de Saúde do Adulto, **Andréia, Cristina Bobroff, Cristina Fontes, Eleine e Inês**, que me apoiaram no processo de seleção do doutorado. Sem vocês eu não teria dado o primeiro passo para realizar esse sonho.

Aos professores do **Departamento de Microbiologia** pelo apoio e orientação. À Coordenação da **Pós Graduação em Microbiologia**, por fornecer condições para a realização deste trabalho. Ao **CNPq** pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa. A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

KERBAUY, Gilselena. ***Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC**: atividade antibiótica de metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*: 2013. 80f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Mais da metade das infecções relacionadas à assistência à saúde são causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos, desafiando a terapia com os fármacos disponíveis. A resistência bacteriana aos carbapenêmicos, com destaque para infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora da carbapenemase KPC, estão associadas à elevadas taxas de mortalidade diretamente relacionadas às limitações impostas por este importante mecanismo de resistência. Em contrapartida, o desenvolvimento de novos fármacos não mantém o mesmo ritmo dos múltiplos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias. Tendo em vista este cenário, a pesquisa por novas substâncias antimicrobianas é indispensável para o controle das infecções multirresistentes. Os produtos naturais desempenham papel importante na descoberta de novos fármacos antimicrobianos. Neste sentido, metabólitos secundários de *Pseudomonas aeruginosa* possuem potencial na produção de substâncias antibióticas, tendo em vista sua complexidade genética e diversidade metabólica.

Palavras-chave: Resistência Microbiana a Medicamentos. Infecção Hospitalar. *Klebsiella pneumoniae*. Agentes Biológicos. Anti-infecciosos. *Pseudomonas aeruginosa*.

KERBAUY, Gilselena. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing KPC: antibiotic activity of secondary metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa*: 2013. 80p. PhD Thesis in Microbiology – State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

More than a half of healthcare associated infections cases are caused by multidrug-resistant organisms, restricting the uses of antimicrobials available. Bacterial resistance to carbapenems, especially infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase KPC-producing, are associated with high rates of mortality directly related to the limitations imposed by this important resistance mechanisms. On the other hand, the development of new drugs does not keep the same of the multiple resistance mechanisms developed by bacteria. In this way, it is clear the urgent need of new and more efficacious compounds for specific treatment of infections caused by multidrug-resistant organisms. Natural products play an important role in the discovery of new antimicrobial drugs. The secondary metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* has potential on producing antibiotic substance, considering your genetic complexity and metabolic diversity.

Keywords: Drug Resistance. Microbial. Cross Infection. *Klebsiella pneumoniae*. Biological Agents. Anti-Infective Agents. *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 –	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
Figura 2 –	Disseminação global da carbapenemase KPC	28
Figura 3 –	Declínio na produção de novos fármacos antimicrobianos	32
Figura 4 –	Variedade funcional e diversidade ambiental do gênero <i>Pseudomonas</i> sp.....	43
Figura 5 –	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44

ARTIGO

Figura 1 –	Microscopia de Fluorescência: Ensaio de viabilidade com o kit BacLight Live/Dead do isolado clínico <i>Kpn</i> -KPC3 não tratado (A) e tratado com 62,5 µg/mL da fração F3d por 8 horas (B)	79
Figura 2 –	Microscopia Eletrônica de Varredura do isolado clínico <i>Kpn</i> -KPC3 não tratado (A) e tratado com 62,5 µg/mL da fração F3d por 1 hora (B).....	80

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Características das classes antimicrobianas de acordo com a estrutura química, aplicação clínica e microrganismos produtor.....	40
---	----

ARTIGO

Tabela 1 – <i>Isolados clínicos de Klebsiella pneumonia produtoras de carbapenemase KPC de acordo com o fenótipo de resistência e o halo de inibição provocado pela fração F3d.....</i>	79
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE	16
3.2	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	17
3.2.1	Resistência aos Carbapenêmicos.....	20
3.3	<i>KLEBSIELLA. PNEUMONIAE</i> PRODUTORA DE CARBAPENEMASE KPC.....	23
3.3.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
3.3.2	Epidemiologia das Infecções por <i>Klebsiella pneumoniae</i> Produtora de KPC	27
3.3.3	Tratamento das Infecções por <i>Klebsiella pneumoniae</i> Produtora de KPC	28
3.4	IMPACTO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	30
3.5	DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS	32
3.6	ANTIMICROBIANOS NATURAIS	34
3.6.1	Antimicrobianos de Origem Vegetal.....	35
3.6.2	Antibióticos de Origem Microbiana	37
3.6.3	Produtos Naturais com Ação Antimicrobiana em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	41
3.7	PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR <i>PSEUDOMONAS</i> SPP.	43
3.7.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
3.7.2	Substâncias com Atividade Antimicrobiana Produzidas por <i>Pseudomonas</i> spp.	45

4	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	ARTIGO - <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase producing - KPC: antibiotic activity of a secondary metabolic compound produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60

INTRODUÇÃO

Os microrganismos multirresistentes desafiam o tratamento das infecções, resultando em danos irreparáveis para a saúde humana em todo o mundo, tornando essa situação não apenas um problema de saúde pública como também uma questão de segurança global (TALBOT et al., 2006; SPELLBERG, 2010; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

De acordo com o *Centers for Disease Control and Preventions* (CDC), aproximadamente 2 milhões de infecções e 23 mil mortes são causadas por microrganismos multirresistentes, e o custo total da resistência antimicrobiana pode chegar a 20 bilhões de dólares ao ano nos Estados Unidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). Este elevado custo no controle destas infecções é justificado pelo uso de antimicrobianos de última geração, conseqüentemente mais caros, e pelo elevado período de hospitalização dos pacientes com infecções de difícil tratamento (ROBERTS et al., 2009).

Estima-se que mais de 70% das bactérias envolvidas nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobianos convencionalmente usados na prática clínica (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2004).

Como exemplo, a resistência bacteriana aos carbapenêmicos, classe de antimicrobianos que representa uma das últimas opções terapêuticas contra infecções graves causadas por patógenos Gram-negativos resistentes (FALAGAS; BLIZIOTIS, 2007). Essas bactérias podem apresentar vários mecanismos de resistência, como alteração na permeabilidade de porinas na membrana externa, alteração do sítio alvo dos antimicrobianos, efluxo e a produção de enzimas que

degradam a molécula antimicrobiana, como as β -lactameses e carbapenemases (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

A produção da enzima carbapenemase é um dos mecanismos mais importantes na resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, predominantemente encontrada em *Klebsiella pneumoniae*, e por isso a denominação *K. pneumoniae* carbapenemase - KPC (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; LIVERMORE, 2012). Esta espécie bacteriana é um importante patógeno humano, responsável por considerável número de IRAS, e tem como infecções mais frequentes as do trato urinário associadas a cateter vesical, da corrente sanguínea associada a cateteres vasculares e a pneumonia associada à ventilação mecânica (BORER et al., 2009; SIEVERT et al., 2013).

O manejo terapêutico de pacientes com infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de KPC é extremamente desafiador. As polimixinas, incluindo a colistina e a tigeciclina são as poucas alternativas terapêuticas para pacientes com essas infecções, entretanto, elevados índices de nefrotoxicidade estão associados às polimixinas (LIM et al., 2010) e a monoterapia com tigeciclina nem sempre é efetiva (MICHAIL et al., 2013). Somado a isso, crescente resistência a colistina vem sendo documentada em muitos países. Essa pan-resistência, como é conhecida, resulta em elevadas taxas de mortalidade (ZAOUTIS, 2009; BORER et al., 2009; HUMPHRIES et al., 2010; ZARKOTOU et al., 2011; TUMBARELLO et al., 2012; QURESHI et al., 2012).

Diante desta situação, respeitadas instituições mundiais alertam para o reduzido número de patentes de novos fármacos antimicrobianos contrastando com o aumento de mortes por infecções multirresistentes (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2004; TALBOT et al., 2006; FINCH; HUNTER, 2006;

SPELLBERG, 2010), deixando evidente a necessidade de pesquisas envolvendo o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos para tratamento das infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de KPC (FINCH; HUNTER, 2006; ; TALBOT et al., 2006; SPELLBERG, 2010).

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antibiótica *in vitro* de uma fração semi purificada obtida do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV, em isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtora da carbapenemase KPC e resistente à colistina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a ação antibiótica *in vitro* da fração isolada do metabolismo secundário de *P. aeruginosa* em isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtora de KPC e resistente à colistina;
- Determinar a concentração inibitória e bactericida mínima da fração antibiótica em isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtora de KPC e resistente à colistina;
- Avaliar a cinética do efeito da fração antibiótica em isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtora de KPC e resistente à colistina;
- Avaliar a citotoxicidade da fração antibiótica em células de mamíferos;
- Identificar as alterações morfológicas provocadas pela fração antibiótica em *K. pneumoniae* produtora de KPC e resistente à colistina.
- Avaliar a ação da fração antibiótica em biofilme formado por *K. pneumoniae* produtora de KPC.

REVISÃO DA LITERATURA

3.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013), a maioria das mortes associadas à resistência antimicrobiana ocorre nos estabelecimentos de saúde, principalmente hospitais, em decorrência das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).

A Portaria 2.616 de 12 de maio de 1998 do Ministério da Saúde, traz as diretrizes e normas para o controle das IRAS, e as define como “qualquer infecção adquirida após a internação do paciente e que se manifeste durante a internação ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a intervenção ou procedimentos hospitalares” (BRASIL, 2000).

Estudo multicêntrico norte-americano mostrou que as IRAS estão associadas a 99.000 óbitos por ano no país (KLEVENS et al., 2007), enquanto estudo europeu concluiu que as IRAS afetam um em cada 10 pacientes internados e estão diretamente relacionadas a aproximadamente 5.000 mortes anuais no continente (INWEREGBU; DAVE; PITTARD, 2005).

No Brasil, o Ministério da Saúde avaliou a magnitude destas infecções em 99 hospitais terciários localizados nas capitais brasileiras e vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS), identificando taxa de IRAS de 13,0% entre pacientes hospitalizados (BRASIL, 2000).

O aumento na expectativa de vida contribui para que grande parte da população mundial receba, em algum momento de suas vidas, assistência à saúde

dentro de um estabelecimento especializado, expondo um grande contingente de pessoas às infecções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

As IRAS desencadeadas por microrganismos resistentes as opções terapêuticas estão relacionadas a custos elevados na assistência, períodos prolongados de hospitalização e aumento na mortalidade, tendo em vista as limitações terapêuticas inerentes a estes microrganismos (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2004).

3.2 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

As Infecções por microrganismos resistentes aos antimicrobianos desafiam a medicina moderna. Enfrentamos a resistência crescente entre vários microrganismos, incluindo vírus, fungos e bactérias, entretanto, a resistência bacteriana assume papel de destaque nas infecções relacionadas à assistência à saúde.

São classificados como bactérias multirresistentes aquelas que apresentam resistência a uma ou mais classe de antimicrobianos de escolha terapêutica e como pan-resistentes, aquelas resistentes a todas as opções terapêuticas disponíveis, limitando consideravelmente as opções de tratamento (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006).

O surgimento e a propagação de microrganismos multirresistentes convergem de múltiplos fatores, como mutações em genes que conferem resistência, troca de informação genética entre os microrganismos pelo fenômeno da conjugação, na qual genes de resistência são transmitidos para novos hospedeiros;

pressão seletiva desencadeada pelo uso de antimicrobianos em hospitais e na comunidade; disseminação global de alguns clones bacterianos multirresistentes; e à incapacidade de alguns laboratórios em identificar os microrganismos resistente e conseqüentemente de aplicar medidas de precaução para doentes infectados ou colonizados por multirresistentes (TENOVER, 2001).

Em todo o mundo, a maioria das infecções fatais é causada por patógenos do grupo “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* sp.). Este grupo de patógenos é encontrado em mais de 40% das infecções relacionadas à assistência à saúde e efetivamente “escapam” (tradução para o português da palavra em inglês, “eskape”) dos efeitos dos fármacos antimicrobianos, mostrando resistência à maioria dos antimicrobianos comumente utilizados (RICE, 2008; BOUCHER et al., 2009).

Em relação às bactérias com potencial patogênico, as Gram-negativas são particularmente mais preocupantes no contexto das infecções multirresistentes aos antimicrobianos. Estas bactérias estão se tornando resistentes a quase todos os antimicrobianos que seriam considerados de primeira escolha para a terapêutica adequada.

Entre as bactérias Gram-positivas a multirresistência também é observada (por exemplo, os *S. aureus* resistentes a metilina – MRSA, e o *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina – VRE), porém não na mesma medida como para as Gram-negativas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

Sabidamente, a característica que diferencia bactérias Gram-negativas de Gram-positivas, é a dupla membrana celular, característica esta que também

contribui para o amplo espectro de resistência em Gram-negativas. A membrana externa exclui moléculas hidrofóbicas ou grandes, incluindo glicopeptídeos, daptomicina e rifampicina, e retarda a entrada de drogas que pode atravessá-la, aumentando a eficácia da próxima linha de defesa. Estas defesas incluem a biosíntese de enzimas β -lactamases do espaço periplasmático e bombas de efluxo da membrana citoplasmática, clivando moléculas antimicrobianas ou bombeando-as para fora do espaço citoplasmático (LIVERMORE, 2012). A combinação de impermeabilidade e *clearance* do espaço periplasmático explica por que bactérias Gram-negativas são naturalmente mais resistentes aos antimicrobianos do que as espécies Gram-positivas, e por que novos antimicrobianos ativos contra elas são mais difíceis de encontrar (LIVERMORE, 2011).

O tratamento de infecções causadas por microrganismos Gram-negativos multirresistentes ou pan-resistente tornou-se um desafio cada vez mais comum em muitos hospitais. Dentre as opções terapêuticas para o controle das infecções, a penicilina e as cefalosporinas de primeira geração foram um dos primeiros antimicrobianos introduzidos na prática clínica. Hoje estes antimicrobianos são raramente prescritos, vista a ampla resistência a esses fármacos pela produção da enzima β -lactamase por Gram-negativas, enzima esta responsável pela lise do anel β -lactâmico presente na estrutura destes antimicrobianos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

As cefalosporinas de amplo espectro, como as de terceira e quarta geração, foram amplamente utilizadas por muitos anos para o controle das infecções causadas por bactérias produtoras da β -lactamase. Todavia, a produção de β -lactamases de espectro estendido (*Extended Spectrum β -Lactamase* - ESBL) por

cepas Gram-negativas, inviabilizou a utilização destes fármacos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

Cepas produtoras de ESBL estão amplamente disseminadas em estabelecimento de saúde de todo o mundo. Para o tratamento destas infecções, a única classe de β -lactâmico remanescente é formada pelos carbapenêmicos (imipenem, meropenem, doripenem e ertapenem), amplamente utilizados pelos serviços de saúde, resultando na crescente e preocupante resistência a esta classe de antimicrobiano (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

Somada a esta problemática, as bactérias resistentes aos carbapenêmicos são geralmente resistentes a todos os β -lactâmicos, restringindo as opções terapêuticas a poucos fármacos disponíveis no mercado (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). Entre as alternativas terapêuticas restantes, a tigeciclina e as polimixinas podem ser usadas com restrições, tendo em vista, respectivamente, a baixa difusão em alguns sítios de infecção e a elevada toxicidade e resistência (MICHAIL et al., 2013).

3.2.1 Resistência aos Carbapenêmicos

Incuráveis ou de difícil tratamento, as infecções por bactérias resistentes aos carbapenêmicos são causadas predominantemente por Enterobactérias e estão em ascensão entre os pacientes hospitalizados (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

Estima-se que 140 mil infecções por Enterobactérias ocorrem ao ano nos Estados Unidos, e aproximadamente 9.300 são causadas por cepas resistentes

aos carbapenêmicos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

Infecções resistentes aos carbapenêmicos estão associadas com elevado riscos de morbidade e mortalidade (BRATU et al., 2005a; FALAGAS et al., 2007; PATEL et al., 2008; MARCHAIN et al., 2008; MUNOZ-PRICE; QUINN, 2009; NGUYEN et al., 2010; SOULI et al., 2010). Sabe-se que quase a metade dos pacientes hospitalizados que desenvolvem infecção da corrente sanguínea por Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos morrem em decorrência da infecção (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

A cada ano, aproximadamente 600 mortes resultam de infecções resistentes aos carbapenêmicos causadas pelas duas principais Enterobactérias, *K. pneumoniae* e *Escherichia coli*. *K. pneumoniae* representa 85% das infecções resistentes aos carbapenêmicos, totalizando 7.900 infecções e 520 mortes atribuídas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

A resistência bacteriana aos carbapenêmicos pode envolver vários mecanismos combinados, tais como a hiperprodução de β -lactamases e/ou ESBL, a produção da enzima carbapenemase, a alteração da permeabilidade de proteínas da membrana externa e/ou hiperexpressão do sistema de efluxo (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

A produção de carbapenemase é o mecanismo mais importante de resistência aos carbapenêmicos. Foi primeiramente descrita em *K. pneumoniae*, derivando a sigla KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase).

Os carbapenêmicos são suscetíveis à hidrólise por carbapenemases serinas e metallo- β -lactamases (MBLs). A classificação de Ambler separa as β -lactamases em quatro grandes classes (A-D) baseada na sequência homóloga de

aminoácidos (YIGIT et al., 2001; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). A classe A, C e D são β -lactamases com o aminoácido serina localizado no seu sítio ativo, enquanto um zinco é encontrado no sítio ativo das enzimas de classe B, conhecidas também como metalo- β -lactamases (NAVON-VENEZIA et al., 2009). As carbapenemases incluem enzimas das classes A, B e D (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

A enzima KPC de classe A é predominante, sendo codificada pelo gene *bla*_{KPC}, frequentemente carregado pelo *transposon* Tn3-based, Tn4401 (THOMSON, 2010), que pode ser transferido para diferentes clones de *K. pneumoniae* e mesmo para outros gêneros de bactérias (NAAS et al., 2008; MUNOZ-PRICE; QUINN, 2009), já tendo sido isolado em *Serratia marcescens*, *E. coli* e outras *Enterobacteriaceae* (BRATU et al., 2005a; BRATU et al., 2007).

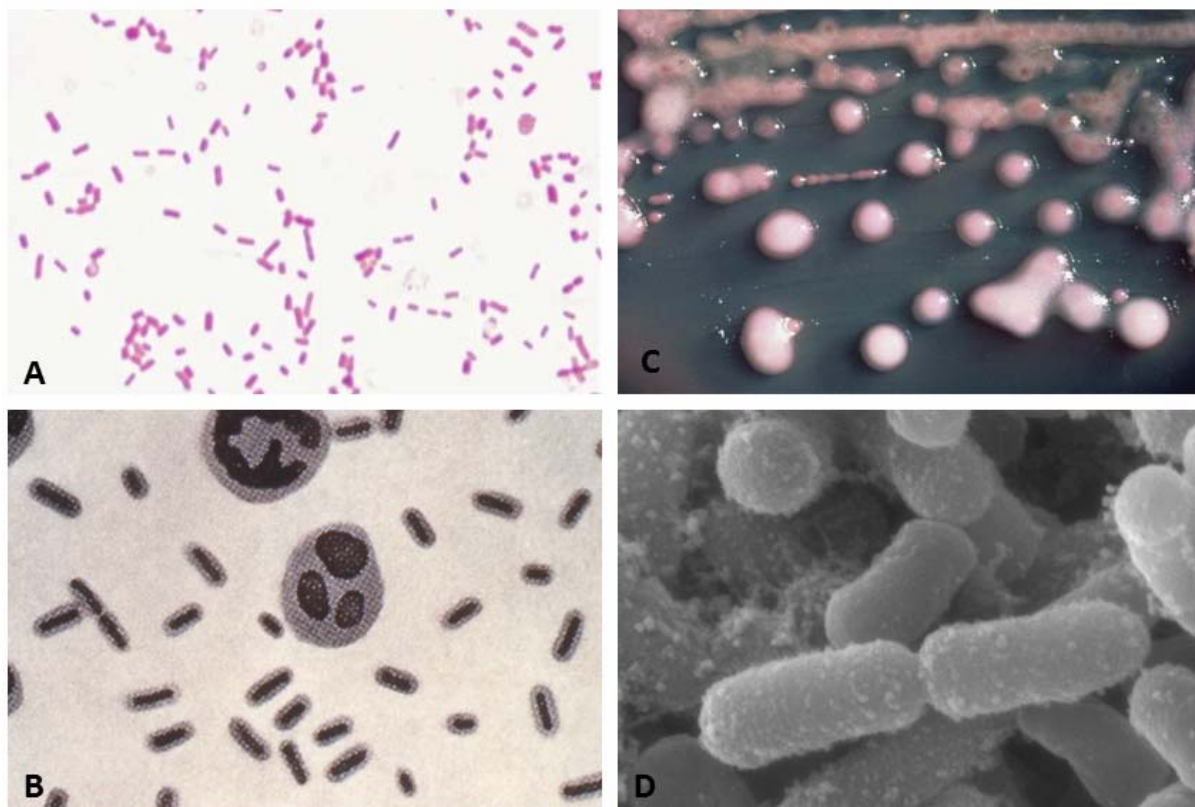
3.3 *K. PNEUMONIAE* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE KPC

3.3.1 *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella*, membro da família *Enterobacteriaceae*, é composto por bacilos Gram-negativos, geralmente encapsulados. Compreende as espécies *K. planticola*, *K. terrigena*, *K. ornithinolytica*, *K. singaporensis*, *K. variicola*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, sendo as duas últimas, importantes patógenos humanos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo e anaeróbico facultativo, que mede aproximadamente 2 µm por 0,5 µm. Possui cápsula polissacarídica conhecida como antígeno K, que confere a esses microrganismos proteção contra a fagocitose, a ação do componente C3b do sistema complemento, resistência ao meio ambiente, além de favorecer a adesão às superfícies (WILLIAMS; TOMAS, 1990; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). As características morfológicas e de crescimento estão apresentadas na figura 1.

Figura 1 – *Klebsiella pneumoniae*. Coloração de Gram em microscopia ótica (A); Fonte: *Infection Disease Society of America*. Fotomicrografia de uma cultura corada pelo método de Hiss com visualização da cápsula polissacarídica (B). Aspecto mucóide de colônias cultivadas em ágar MacConkey (C); Fonte: *Public Health Image Library - Centers for Disease Control and Prevention*. Microscopia Eletrônica de Varredura de *K. pneumoniae* (D); Fonte: Laboratório de Ecologia Microbiana – UEL.



Esta espécie bacteriana possui relevância nas infecções humanas, principalmente relacionadas à assistência à saúde (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). É comumente encontrada como colonizante do trato gastrointestinal, nasofarínge e mãos dos profissionais de saúde (PODSCHUN; ULLMANN, 1998), além de serem também isoladas do meio ambiente, como água, solo e esgoto (BRISSE; VERHOEF, 2001). Sua ubiquidade também reflete na presença deste patógeno em ambientes hospitalares como pisos, pias, desinfetantes e equipamentos inalatórios, o que facilita a colonização dos pacientes hospitalizados (HOBSON; BONTEN; JARVIS, 1996).

Existe uma grande variedade de infecções causadas por esses patógenos, podendo acometer sítios diversos do organismo. As infecções mais prevalentes são relacionadas a dispositivos de assistência à saúde, como infecção urinária relacionada à cateterização vesical, pneumonia relacionada a ventilação mecânica, infecção de pele e partes moles relacionadas a procedimentos cirúrgicos e infecção da corrente sanguínea relacionada a cateteres venosos (SIEVERT et al., 2013). Diante destes dados, é inevitável a associação destas infecções com a formação de biofilmes, tendo em vista a suscetibilidade dos dispositivos invasivos a este evento (ANDERL; FRANKLIN; STEWART, 2000).

Os biofilmes são definidos como comunidades bacterianas estruturadas, imersas em uma matriz de exopolissacarídeo e aderidas às superfícies abióticas ou biológicas (COSTERTON et al., 1995).

A formação do biofilme é um processo complexo que requer várias etapas. A primeira delas, a adesão, compreende a associação dos microrganismos à superfície e/ou a outros organismos anteriormente aderidos à superfície. Fímbrias e pilis são as estruturas bacterianas relacionadas à adesão. Em *K. pneumoniae* as fímbrias do tipo 1 e 3 são responsáveis por esse processo (STAHLHUT et al., 2012). A segunda etapa define uma associação estável com membros das microcolônias e, finalmente, a produção e estruturação da matriz de polímeros, chamado glicocálix, onde as bactérias são incorporadas (MARTINO et al., 2003).

A evasão do sistema imunológico e a resistência antimicrobiana estão entre as principais consequências da formação do biofilme. Isso ocorre, pois as substâncias poliméricas da matriz formam um escudo sobre as bactérias, impedindo a opsonização das células fagocitárias (COSTERTON et al., 1995; JENSEN et al., 1990) e a ligação do antimicrobiano ao seu sítio de ação (ANWAR; STRAP;

COSTERTON, 1992; DAROUICHE et al., 1994; VRANY; STEWART; SUCI, 1997, KIM et al., 2010), causando falhas terapêuticas com necessidade de remoção dos dispositivos invasivos.

Infecções do trato urinário relacionadas a cateteres estão fortemente ligadas a formação de biofilme, e *K. pneumoniae* é um dos principais agentes causais destas infecções (MACLEOD; STICKLER, 2007; SIEVERT et al., 2013).

Somada a sua significativa patogenicidade e sua capacidade de formar biofilme, *K. pneumoniae* resistente aos antimicrobianos são frequentes agentes causadores de infecções (CORREA et al., 2013; SIEVERT et al., 2013). Seus múltiplos mecanismos de resistência, adquiridos na maioria das vezes pela transferência horizontal de genes como plasmídeos e transposons levam às falhas terapêuticas e a elevado índice de mortalidade (SILVA; TRAEBERT; GALATO, 2012).

Como citado anteriormente, *K. pneumoniae* tem sido o foco de um alerta mundial relativo à resistência aos carbapenêmicos (MCKENNA, 2013). A principal estratégia desta espécie bacteriana para inativar este antimicrobiano é a produção da enzima carbapenemase (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

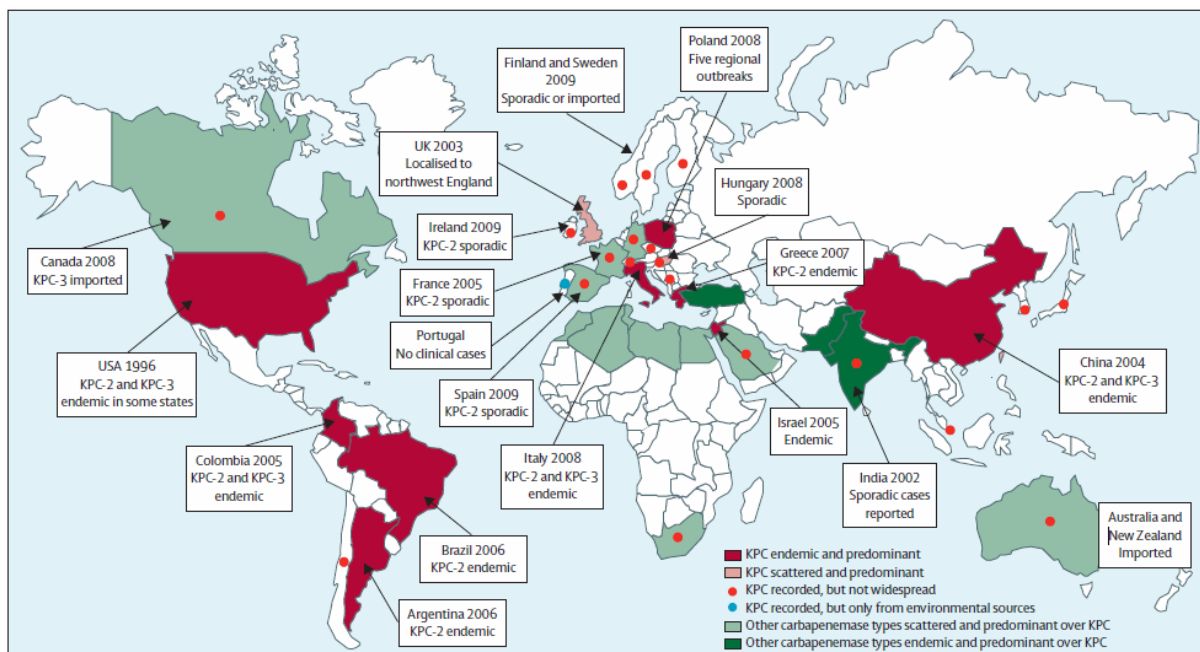
3.3.2 Epidemiologia das Infecções por *Klebsiella pneumoniae* Produtora de KPC

Inicialmente isolada na Carolina do Norte, EUA, em 1996 (YIGIT et al., 2001), *K. pneumoniae* produtora de KPC disseminou-se para outros estados e países a partir de 2001, atingindo Canadá, Argentina, Brasil, China, Índia, Taiwan e praticamente por todo continente europeu, com destaque para Israel, Grécia e Itália (MONTEIRO et al, 2009; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; PEIRANO et al., 2009; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; CHEN; ANDERSON; PATERSON, 2012), tornando-se um problema de saúde pública e de segurança global (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2004; TALBOT et al., 2006; SPELLBERG, 2010).

Atualmente é considerada endêmica em alguns estados dos EUA, Israel, Colômbia, Grécia, Porto Rico e em algumas cidades Brasileiras (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011), como é o caso da cidade de Londrina – PR, de acordo com dados da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (CCIH – HU/UEL).

Até o momento, quatorze diferentes variantes da KPC foram encontradas (KPC-2 – KPC-15), sendo a KPC-2 e a KPC-3 as mais frequentes (HUSSEIN et al., 2009; SOULI et al., 2010; MUNOZ-PRICE et al., 2013). A figura 2 apresenta a distribuição da enzima carbapenemase KPC em todos os continentes, especificando a variante da enzima e sua relevância epidemiológica.

Figura 2 - Disseminação Global da Carbapenemase KPC.



Distribuição epidemiológica da enzima KPC em todos os continentes.

Fonte: Munoz-Price et al. (2013).

3.3.3 Tratamento das Infecções por *Klebsiella pneumoniae* Produtora de KPC

Além da resistência aos carbapenêmicos, cefalosporinas e aztreonam, adicionais mecanismos de resistência são comumente encontrados em plasmídeos isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, conferindo resistência cruzada à outras classes de antimicrobianos, como às fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (BORER et al., 2009).

A adição comercial de inibidores das β -lactamases (ácido clavulônico, sulbactam ou tazobactam) apenas resultam em redução das concentrações inibitórias do antimicrobiano (ENDIMIANI et al., 2009), inviabilizando sua aplicabilidade clínica.

Como resultado, a resistência de *K. pneumoniae* produtora de KPC a amplo espectro de antimicrobianos traz limitações importantes ao tratamento das infecções, restando poucas opções de fármacos disponíveis no mercado, hoje os

aminoglicosídeos, tigeciclina e a polimixina. Contudo, falhas terapêuticas já foram relatadas para estas opções (BRATU et al., 2005b; BRATU et al., 2005c; CASTANHEIRA et al., 2008).

O insucesso do tratamento pode estar relacionado com o sítio infeccioso e a farmacocinética do antimicrobiano. Como exemplo, a tigeciclina, antimicrobiano da classe das gliciciclinas, tem mostrado potente atividade *in vitro* contra *K. pneumoniae* produtora de KPC, entretanto não é recomendada para o tratamento de infecções da corrente sanguínea, tendo em vista as baixas concentrações séricas que atinge (MURALIDHARAN et al., 2005a; MURALIDHARAN et al., 2005b; RODVOLD et al., 2006). Seu uso nas infecções urinárias também é questionável devido as baixas concentrações encontradas na urina (MEAGHER et al., 2005).

As limitações dos aminoglicosídeos incluem a baixa penetração em ambientes ácidos, impossibilitando o tratamento de abscessos ou infecções intra-abdominais causadas por *K. pneumoniae* produtora de KPC (STRAUSBAUGH; SANDE, 1978; WAGNER; SAUERMAN; JOUKHADAR, 2006).

Em relação a polimixina, somada a sua elevada nefrotoxicidade, este fármaco possui baixa penetrabilidade no epitélio pulmonar (LEVIN et al., 1999; MONTERO et al., 2002), comprometendo o tratamento das pneumonias, uma das principais infecções relacionadas à assistência à saúde por *K. pneumoniae* produtora de KPC (SIEVERT et al., 2013).

Em vista do exposto, poucas são as opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de KPC (WALTHER-RASMUSSEN; HIBY, 2007). Tal situação potencializa a disseminação

das infecções, aumenta o período de hospitalização e os custos do tratamento, sobretudo, coloca em risco a vida dos pacientes (PILLAI et al., 2009).

3.4 IMPACTO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Passados apenas 70 anos da introdução do antimicrobiano na prática clínica, nos deparamos com a possibilidade de um futuro sem efetivos antimicrobianos no tratamento das infecções. Este cenário é decorrente da crescente resistência antimicrobiana, habilidade dos microrganismos em tornarem-se resistentes aos fármacos dos quais eram sensíveis. (TRANSATLANTIC TASKFORCE ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE - TATFAR, 2011).

Quando um antimicrobiano é usado, a pressão seletiva favorece o crescimento de microrganismos resistentes à ação do fármaco. O extensivo uso de antimicrobianos tem resultado em resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, comprometendo o sucesso do tratamento das infecções e o poder de salvar vidas desses fármacos (TRANSATLANTIC TASKFORCE ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE - TATFAR, 2011).

Os antimicrobianos estão entre os medicamentos mais comumente utilizados na medicina humana e por isso a resistência antimicrobiana é uma das mais sérias ameaças a saúde. A perda da efetividade de alguns antimicrobianos irá nos impossibilitar de lutar contra as doenças infecciosas, hoje, uma das principais causas de morte em todo o mundo (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

Infecções resistentes aos antimicrobianos geram aumento nos custos evitáveis do sistema de saúde. Na maioria dos casos, essas infecções requerem

tratamentos prolongados e/ou mais caros, estendem o período de internação, exigem consultas adicionais, complicações, e maior índice de mortalidade em comparação com infecções que são facilmente tratáveis com antimicrobianos de primeira escolha (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2004).

Nos EUA, estimativas mostram que o custo com a saúde, ocasionados pela resistência aos antimicrobianos excede em até 20 bilhões de dólares, podendo chegar a 35 bilhões anuais quando as consequências da resistência antimicrobiana refletem na perda da produtividade da sociedade (ROBERTS et al., 2009).

De acordo com dados globais do IMS *Health*, em 2008 foram gastos 26,5 bilhões de dólares com antimicrobianos e, estima-se que em 2018 este gasto alcançará o valor de 28,2 bilhões de dólares (IMS GLOBAL PHARMACEUTICAL MARKET FORECAST, 2008).

Mesmo quando alguma alternativa terapêutica existe, estudos tem mostrado que os pacientes com infecções multirresistentes tem maior tendência a evoluírem a óbito, e alguns sobreviventes são vítimas de sequelas decorrentes das complicações infecciosas, como a sepse (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2004).

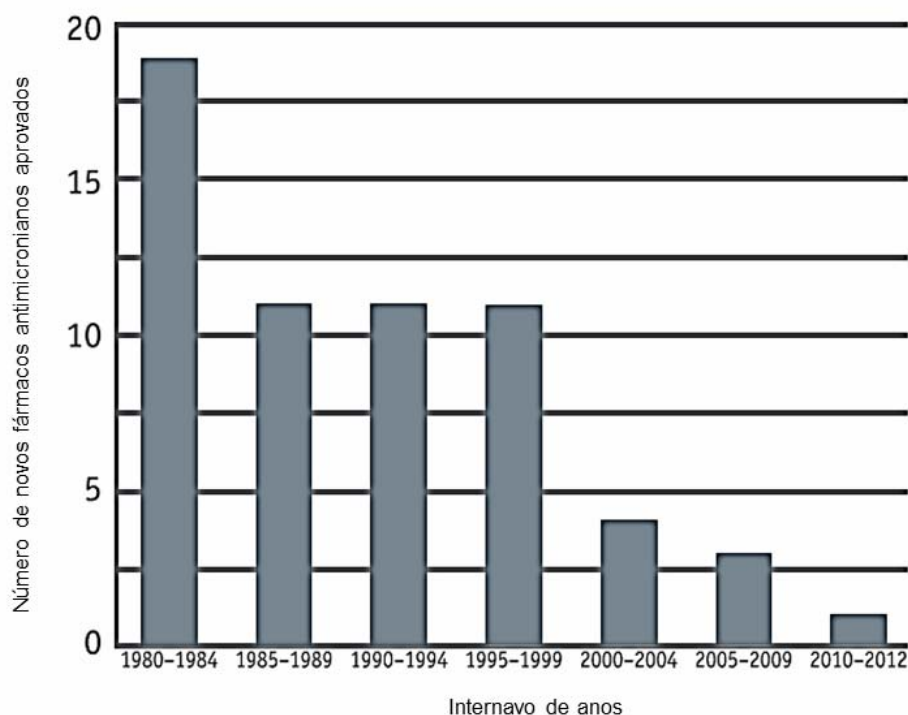
O desenvolvimento técnico-científico da medicina avança a largos passos, entretanto, a velha ferramenta usada na Segunda Guerra Mundial para tratar as infecções dos feridos não mantém o mesmo passo. Se a ação dos fármacos antimicrobianos for perdida pela resistência microbiana, os avanços da medicina não terão aplicabilidade e também se perderão.

3.5 DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

A resistência aos antimicrobianos e o desenvolvimento de novos compostos com ação antimicrobiana caminham em ritmo diferente (TENOVER, 2001; ZAOUTIS, 2009; CHEN; ANDERSON; PATERSON, 2012). O crescente número de óbitos relacionados às infecções por bactérias resistentes contrasta com o reduzido número de patentes de novos fármacos antimicrobianos (SPELLBERG, 2010).

O número de novos antimicrobianos desenvolvidos e aprovados diminuiu consideravelmente nas últimas três décadas, refletindo em poucas opções para o tratamento das infecções bacterianas resistentes (Figura 3).

Figura 3 - Declínio na produção de novos fármacos antimicrobianos.



Número de novos fármacos antimicrobianos aprovados *versus* intervalo de anos.
Fonte: Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* (2013).

O *Institute of Medicine (IOM)*, o *Centers for Disease Control and Prevention*, o *National Institutes of Health (NIH)*, e o *Food and Drug Administration (FDA)* vem alertando quanto a grave ameaça à saúde pública pelas bactérias resistentes, especialmente considerando que existem poucos fármacos em fases clínicas experimentais para combater os microrganismos multirresistentes (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2004).

A resistência aos antimicrobianos ocorre como um processo natural na evolução dos microrganismos. As bactérias irão inevitavelmente encontrar formas de resistir aos antimicrobianos desenvolvidos, e por esse motivo, ações agressivas devem ser incentivadas no âmbito da produção de novos fármacos, mantendo o desenvolvimento dos antimicrobianos a frente da resistência bacteriana (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

Em setembro de 2009, o *European Centre for Disease Prevention and Control* e a *European Medicines Agency* apresentaram um relatório (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL/EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2009) mostrando que apenas 15 fármacos antimicrobianos estão em desenvolvimento, entretanto, nenhum destes mostrou ser capaz de tratar bactérias multi ou pan-resistentes (SPELLBER, 2010).

Em um breve panorama apresentado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (2013), é possível observar que os últimos fármacos aprovados para uso em humano já mostram limitações no tratamento das infecções por *K. pneumoniae* produtora de KPC.

Disponível no mercado a partir de 2001, o Ertapenem (carbapenem) perdeu sua efetividade com a disseminação da carbapenemase KPC. Outra opção para o tratamento das infecções por enterobactérias é a gemifloxacina, uma

fluorquinolona introduzida no mercado em 2003. Todavia, este fármaco não é efetivo para infecções multirresistentes, e restringe-se apenas ao tratamento das infecções comunitárias (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

A tigeciclina, aprovada a partir de 2005, é frequentemente o único agente antimicrobiano que ainda apresenta ação contra bactérias produtoras da carbapenemase KPC em algumas situações, embora a resistência esteja emergindo como em alguns casos já documentados (MICHAIL et al., 2013). Além disso, mesmo na ausência da resistência, a efetividade deste agente é limitada, tendo em vista sua baixa penetrabilidade em alguns sítios infecciosos (BRATU et al., 2005b; BRATU et al., 2005c; CASTANHEIRA et al., 2008).

O doripenem (em uso humano a partir de 2007) também teve sua efetividade comprometida pela disseminação da carbapenemase KPC, e o mais recente lançamento antimicrobiano, há 3 anos, o ceftaroline é inativado pelas enzimas ESBL e carbapenemases (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

Este breve levantamento sobre as mais novas opções terapêuticas antimicrobianas deixa claro a urgência na descoberta de novos compostos antimicrobianos.

3.6 ANTIMICROBIANOS NATURAIS

A variedade e a complexidade de compostos antimicrobianos produzidos na natureza são enormes. Aproximadamente metade dos medicamentos antimicrobianos aprovados entre 1981 e 2006 é à base de compostos naturais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2007), e os produtos

naturais continuam a desempenhar um papel importante na descoberta de novos fármacos antimicrobianos.

3.6.1 Antimicrobianos de Origem Vegetal

Produtos naturais derivados de plantas forneceram à indústria farmacêutica uma das suas mais importantes fontes de compostos. Acredita-se que aproximadamente 40% dos medicamentos modernos são derivados de vegetais, usando substâncias naturais ou semi sintetizadas (GAUTAM; SAKLANI; JACHAK, 2007).

Em todo o mundo, em diferentes culturas e desde muitos séculos, pessoas usaram plantas para tratar doenças e infecções, e isto tem gerado interesse sobre a biodiversidade de plantas com potencial ação antimicrobiana na busca por novos fármacos (NIÑO; MOSQUERA; CORREA, 2012).

Entretanto, uma pequena porcentagem dos produtos de origem fitoterápica distribuídos pela indústria farmacêutica possui atividade antimicrobiana, sendo a maioria de fontes bacterianas e fúngicas (COWAN, 1999).

Os compostos antimicrobianos extraídos de plantas geralmente são metabólitos secundários, úteis como mecanismos de defesa da planta contra predadores, insetos, herbívoros, e microrganismos. Os terpenos, por exemplo, conferem a planta seus odores e sabores, como o terpeno de pimenta. Outros (quinonas e taninos) são responsáveis pelo pigmento da planta (COWAN, 1999).

Entre as principais classes de fitoquímicos com ação antimicrobiana temos os compostos fenólicos, terpenos e óleos essenciais, alcaloides, lecitinas e polipeptídeos (COWAN, 1999).

Os fenólicos compõem os principais antimicrobianos fitoquímicos. Dentre eles os fenóis simples ou ácidos são efetivos contra vírus, bactérias e fungos (COWAN, 1999), agindo na privação de substratos (PERES et al., 1997) e ruptura de membranas (TODA et al., 1992).

As quinonas possuem um grande potencial antimicrobiano. São altamente reativas, fontes de radicais livres e conhecidas por se ligarem irreversivelmente a aminoácidos em proteínas, inativando-as (STERN et al., 1996). Em microrganismos, seus alvos são as adesinas de superfície, polipeptídeos da parede celular e enzimas (KING; TEMPESTA, 1994). Efeito bacteriostático em *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphthericum*, e *P. aeruginosa*, e bactericida em *P. pseudomalliae* já foi descrito (KAZMI et al., 1994).

Outra subclasse de fenóis são os flavonóides, eficazes antimicrobianos contra uma grande variedade de microrganismos. Sua eficiência deve-se a capacidade de se ligar às proteínas de superfície e complexar-se com a parede celular bacteriana, além de provocar a lise das membranas (TSUCHIYA et al., 1996). Estudos mostraram ação antimicrobiana em *Vibrio cholerae* (BORRIS, 1996), *Streptococcus mutans* (SAKANAKA et al., 1989) e *Shigella* (VIJAYA; ANANTHAN; NALINI, 1995).

Quanto aos taninos, a ação antimicrobiana deste composto é semelhante às quinonas, relacionado à sua capacidade de inativar adesinas microbianas, enzimas e proteínas de transporte da membrana celular externa (SCALBERT, 1991; HASLAM, 1996).

Os coumarins são responsáveis pelo odor das plantas. Sua ação anticoagulante, particularmente as warfarinas, é amplamente difundida pela indústria

farmacêutica. Sua atividade antifúngica (THORNES, 1997) e antiviral (BERKADA, 1978) foram previamente descrita em experimentos *in vitro*.

Em relação a classe dos terpenos e óleos essenciais, responsáveis pelo odor das plantas, sua atividade antimicrobiana pode estar relacionada a ruptura de membrana pelos compostos lipofílicos. Sua atividade no controle de bactérias, fungos, vírus e protozoários foi extensivamente pesquisada (COWAN, 1999).

Entre os alcaloides extraídos de plantas, o grupo das berberinas destaca-se pelos efeitos antimicrobianos em Tripanossomos (FREIBURGHHAUS et al., 1996) e seu mecanismo de ação é atribuído à habilidade de intercalar-se ao DNA (PHILLIPSON; O'NEILL, 1987).

A atividade antimicrobiana das lecitinas e polipeptídeos contra bactérias, fungos e vírus, pode estar relacionada à formação de canais iônicos na membrana microbiana ou inibição competitiva da aderência das proteínas microbianas ao hospedeiro (TERRAS et al., 1993; DE BOLLE et al., 1996).

3.6.2 Antibióticos de Origem Microbiana

Produtos naturais produzidos por microrganismos como estratégia de sobrevivência em seu ambiente natural (metabólitos secundários) tem sido a fortaleza na descoberta dos fármacos antibióticos (DEVASAHAYAM; SCHELD; HOFFMAN, 2010).

Dada a intensa pressão de seleção exercida sobre as espécies bacterianas em ambiente como solo, sedimentos marinhos, esgoto e processos infecciosos crônicos, não é surpresa que estas fontes microbianas tem provado ser

sucesso para a descoberta de novos antibióticos (WONG; OLIVER; LININGTON, 2012).

Em meados do século XIX, Louis Pasteur observou que alguns microrganismos destruíam outros, mais tarde este fenômeno foi denominado “antibiose”.

Alexander Fleming, em 1928, observou a presença de halo de inibição do crescimento de colônias de *S. aureus* em placas contaminadas acidentalmente por *Penicillium notatum* (denominado alguns anos depois como *P. chrysogenum*). A partir desta observação, Fleming produziu um filtrado purificado da cultura fúngica, cujo agente antibiótico foi nominado penicilina pelo pesquisador. Após 12 anos de seu descobrimento, a penicilina foi comercializada e utilizada em larga escala durante a Segunda Guerra Mundial, curando 95% dos feridos em batalhas. Em 1945 Fleming ganhou o Prêmio Nobel de medicina, marcando a era de ouro do tratamento antimicrobiano.

Selman Waksman, um imigrante russo dos Estados Unidos, após passar anos buscando novos compostos antimicrobianos, realizando experimentos de antibiose entre vários microrganismos, descobriu nos anos de 1940 vários antibióticos produzidos por bactérias isoladas do solo, como o actynomin, streptomycin e neomycin, definindo os antibióticos como “*uma substância química derivada de microrganismos que tem a capacidade de inibir o crescimento, ou mesmo destruir, outros microrganismos*”. Em 1943 encontrou um fungo capaz de inativar *Mycobacterium* spp. Ele chamou este aminoglicosídeo de estreptomicina, em decorrência do seu isolamento de culturas de *Streptomyces*, que salvou a vida de uma jovem com tuberculose pulmonar avançada em 1944. Waksman recebeu o Prêmio Nobel de medicina em 1952 pela sua descoberta.

A partir desses grandes nomes, outras penicilinas e aminoglicosídeos foram desenvolvidos, e novas classes de antimicrobianos surgiram. Hoje, mais de 10.000 substâncias com ação antimicrobiana são conhecidas e aproximadamente 250 produzidas em escala comercial para aplicabilidade clínica (KHARDORI, 2006; ROKEM; LANTZ; NIELSEN, 2007).

Nos últimos 15 anos, o desenvolvimento de antimicrobianos tem sido em grande parte restrito a derivações sintéticas de produtos naturais microbianos para criar análogos de fármacos de primeira geração (CLARDY; FISCHBACH WALSH, 2006; FISCHBACH; WALSH, 2009).

Hoje, mais de 60 anos após a introdução da penicilina como um antimicrobiano comercial, a produção anual deste fármaco excede 60.000 toneladas ao ano, e a maior parte da penicilina produzida é convertida por síntese química a antimicrobianos mais eficazes como a ampicilina, amoxicilina e cefalexina (ROKEM; LANTZ; NIELSEN, 2007).

A vasta gama de diferentes estruturas químicas encontradas em antibióticos naturais pode ser dividida nos seguintes grupos químicos: peptídeos, policetídeos, glicopeptídeos e aminoglicosídeos, como exemplificados na tabela 1 de acordo com as indicações clínicas e os microrganismos produtores.

Tabela 1 – Características das classes antimicrobianas de acordo com a estrutura química, aplicação clínica e microrganismos produtor.

Grupos de Antibióticos e Exemplos	Aplicação	Microrganismo Produtor
Peptídeos		
Penicilina	Gram +	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Cefalosporina	Gram + e Gram -	<i>Streptomyces clavuligerus</i> ou <i>P. chrysogenum</i>
Bacitracina	Uso tópico. Ação contra cocos infecciosos	<i>Bacillus subtilis</i>
Poliquetídeos		
Eritromicina	Opcional a penicilina em pacientes alérgicos	<i>Saccharopolyspora erythra</i>
Nistatina	Infeções fúngicas	<i>Streptomyces noursei</i>
Tetraciclina	Amplio espectro para infecções bacterianas	<i>Streptomyces</i> spp.
Glicopeptídeos		
Vancomicina	Gram +	<i>Streptomyces orientalis</i>
Aminoglicosídeos		
Kanamicina	Gram - (enterobactérias)	<i>Streptomyces griseus</i>
Amicacina (semi-sintética derivada da Kanamicina)	Gram -	-
Gentamicina	Gram + e Gram -	<i>Micromonospora</i> sp.

Fonte: Adaptado de Rokem; Lantz e Nielsen (2007).

Dentre os microrganismos produtores de substâncias antibióticas, os *Streptomyces* spp. e *Bacillus* spp. se destacam, entretanto, os metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas* spp. tem despertado interesse em relação as suas propriedades antibióticas .

3.6.3 Produtos Naturais com Ação Antimicrobiana em *Klebsiella pneumoniae*

Em um levantamento referente a estudos publicados nos últimos 5 anos, poucas foram as opções de produtos naturais eficazes no controle de *K. pneumoniae*. Este número é ainda mais reduzido quando se trata de cepas produtoras da carbapenemase KPC.

Em relação aos produtos naturais derivados de plantas, testados em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, *Triphala Mashī*, *Zingiber corallinu*, *Brassica oleracea* e o líquen *Parmotrema* sp. mostraram atividade antimicrobiana.

Triphala Mashī é uma tradicional formulação herbal composta por frutos secos de três plantas medicinais: *Terminalia chebula*, *Terminalia belerica* e *Phyllanthus embelica*. *Triphala* significa 'três' (tri) 'frutos' (phala). Seus compostos fenólicos são usados pela medicina alternativa para o tratamento de uma variedade de condições devido as suas propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e hipoglicemiantes. Biradar e colaboradores (2011) mostraram que tanto o extrato aquoso quanto o alcoólico desta solução mostraram amplo espectro de ação antimicrobiana *in vitro* quando testados em isolados clínicos Gram-positivos e negativos, incluindo isolado multirresistentes de *K. pneumoniae* (amicacina, ciprofloxacina, cefotaxima, cefatazidima, cefuroxima, ceftriaxona e piperacillina resistente), isolada de um abscesso de ferida abdominal.

Atividade bactericida em *K. pneumoniae* ESBL foi observada em experimento *in vitro* que avaliou a ação do extrato de *Brassica oleracea* em isolados clínicos (HAFIDH et al., 2011). Este vegetal, conhecido popularmente por repolho roxo é rico em flavonóides, substância cuja ação antibacteriana já foi relatada (SIMONETTI; GARDANA; PIETTA, 2001).

Efeito bacteriostático do óleo essencial de *Zingiber corallinum* foi observado em isolados clínicos bacterianos multirresistentes, incluindo isolado clínico de *K. pneumoniae* resistente a penicilina, cefalosporina e aztreonam (YANG et al., 2011). O *Z. corallinum* tem funções anti-inflamatórias, desintoxicantes e antibacterianas previamente descritas (CAO; ZHANG; ZHU, 1989; ZHANG; YU, 2004).

O potencial antimicrobiano do líquen *Parmotrema* sp. também estende-se à *K. pneumoniae* resistente a tigeciclina (CHAUHAN; ABRAHAM, 2013). Várias atividades biológicas de líquens e seus metabólitos são conhecidas, tais como a atividade antiviral, antitumoral, antialérgica e antimicrobiana. Os metabólitos secundários com atividade antimicrobiana são derivados de terpenos (RANKOVIC; KOSANIC; STANOJKOVIC, 2011).

Em relação aos produtos naturais produzidos por microrganismos, a bacteriocina produzida por *Citrobacter freundii* (ATCC 43864) mostrou atividade antibiótica e antibiofilme em isolados clínicos multirresistentes de *K. pneumoniae* (SHANKS et al., 2012).

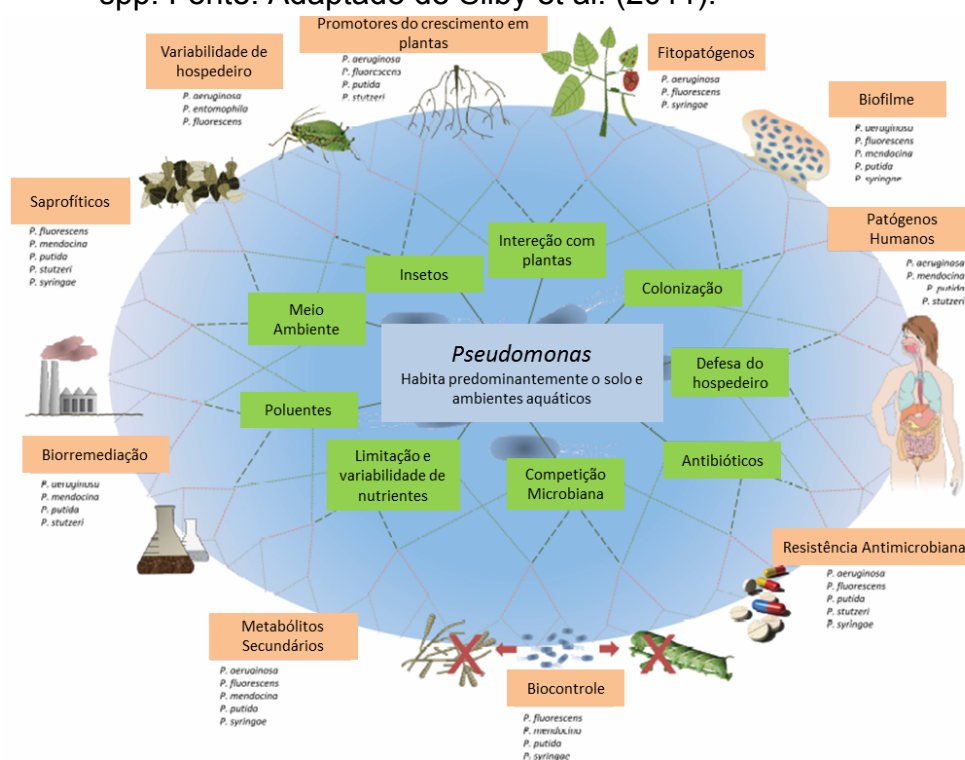
Para o controle de *K. pneumoniae* produtora de KPC, a única alternativa natural foi apresentada por Melo-Silveira e colaboradores (2012), que mostraram reduzida atividade bacteriostática e antibiofilme do composto Xylan, um polissacarídeo extraído de espigas de milho.

3.7 PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS POR *PSEUDOMONAS* SP

3.7.1 *Pseudomonas aeruginosa*

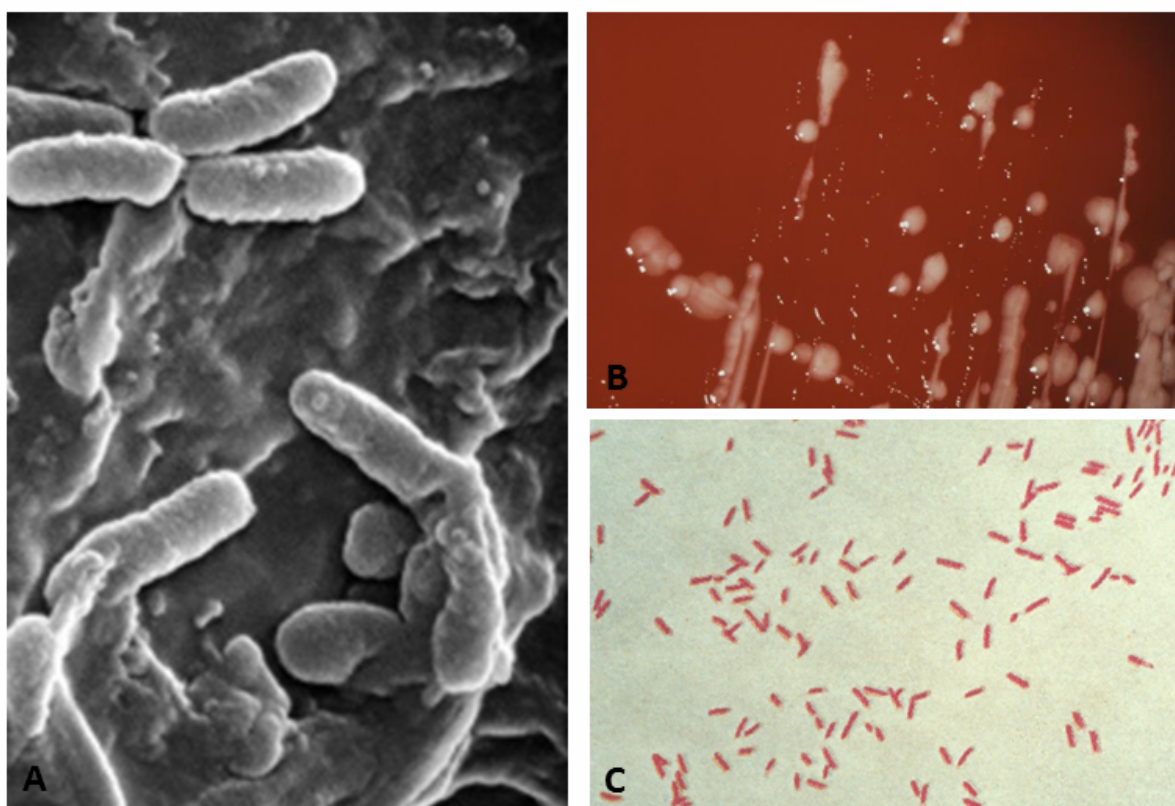
O gênero *Pseudomonas* foi primeiramente descrito em 1894 e é um dos gêneros mais diversos e estudados. Composto por mais de 60 espécies, exibe diversos estilos de vida em uma grande variedade de ambientes, incluindo solo, deserto, água, mar, superfícies de plantas e animais e isolados clínicos patológicos (SILBY et al., 2011). São de grande interesse devido à sua importância como patógeno e seu crescente potencial nas aplicações biotecnológicas (Figura 4).

Figura 4 – Variedade funcional e diversidade ambiental do gênero *Pseudomonas* spp. Fonte: Adaptado de Silby et al. (2011).



Pseudomonas aeruginosa é destaque neste gênero, é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia, baciliforme, com diâmetro aproximado de 0,5 μm e comprimento variando de 1 a 5 μm , apresenta mobilidade por um flagelo polar. As características da colônia e morfologia são apresentadas na figura 5.

Figura 5 - *Pseudomonas aeruginosa*. Microscopia Eletrônica de Varredura (A); Colônias cultivadas em ágar sangue (B); Coloração de Gram em Microscopia ótica (C). Fonte: *Public Health Image Library - Centers for Disease Control and Prevention*.



Essa espécie possui relevância epidemiológica nas infecções em humanos, atuando como patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos, sendo um dos principais agentes etiológicos das infecções em portadores de fibrose cística (LYCZAK; CANNON; PIER, 2002). A resistência intrínseca a uma vasta gama de compostos antimicrobianos dificulta o tratamento destas infecções, agravando a saúde dos pacientes infectados por esse patógeno (HOIBY, 1993).

Uma das características marcantes desta espécie é sua habilidade em catabolizar uma gama de moléculas orgânicas. Esta característica contribui com a ubiquidade desta espécie, o que torna este organismo o mais abundante na Terra, tendo em vista sua capacidade de sobreviver em ecossistemas oligotróficos (FRIMMERSDORF et al., 2010; SONNLEITNER et al., 2012). Essa extraordinária capacidade de adaptação deve-se ao fato desta espécie apresentar uma grande complexidade genética. O sequenciamento completo do genoma da cepa *P. aeruginosa* PA01 (STOVER et al., 2000) mostrou que o grande número de genes produtores de proteínas refletem em um complexo e variado sistemas de transporte e produção enzimática, o que favorece seu grande arsenal metabólico e notoriedade na produção de metabólitos secundários biologicamente importantes (GROSS; LOPER, 2009).

3.7.2 Substâncias com Atividade Antimicrobiana Produzidas por *Pseudomonas* spp.

O uso de antibióticos produzidos por *Pseudomonas* spp. data de um período anterior a “era dos antibióticos”. Em 1899 Emmerich e Löw publicaram os resultados da pesquisa que isolou o primeiro antibiótico descrito até então. A piocianase foi extraída do sobrenadante de uma cultura de *P. aeruginosa*, e mostrou atividade bactericida contra várias espécies, sendo extensivamente usada no início do século XX no tratamento da difteria, meningite e influenza. Entretanto por problemas de padronização do produto, não existiam técnicas para garantir que cada fração produzida da substância pudesse ser igualmente efetiva, causando insucesso em alguns casos, o que levou ao abandono desta substância antibiótica (LEISINGER; MARGRAFF, 1979).

A maioria das substâncias antibióticas produzidas por *Pseudomonas* spp. é fruto do metabolismo secundário deste gênero. A produção de metabólitos secundários confere vantagens ao microrganismo produtor na competição com outros organismos, por isso normalmente possuem atividade antibiótica e são resultado da própria atividade biológica. Os metabólitos secundários de *Pseudomonas* spp. encontraram sua função terapêutica a mais de 100 anos e até hoje mantém o interesse da indústria farmacêutica.

A maioria das substâncias antibióticas produzidas por *Pseudomonas* spp. são da classe das fenazinas, indolinonas, pirrolnitrina e compostos lipídicos. Outros compostos com efeito antibiótico são os aminoácidos, peptídeos, lipídios, glicolipídios e compostos alifáticos, produzidos pelo metabolismo secundário deste gênero.

Os compostos lipídicos produzidos pelo metabolismo secundário de *P. aeruginosa* foram descobertos pela primeira vez em 1945 (HAYS et al., 1945) e mostraram ser mais efetivos contra Gram-positivos. A ação destes compostos contra *Mycobacterium tuberculosis* também foi elucidada (BERGSTROM; THEORELL; DAVIDE, 1947). Seu mecanismo de ação está relacionado à inibição do transporte de elétrons pelo citocromo, razão pela qual inibe o crescimento microbiano (LIGHTBOWN; JACKSON, 1956).

O ácido pseudomônico foi isolado em 1971 de uma cepa de *P. fluorescense* (BANKS et al., 1971) e possui elevada atividade antimicrobiana contra Gram-positivos (HUGHES, J.; MELLOWS, 1978). Conhecido também como mupirocina (Bactroban[®]), é usado em composições tópicas para o tratamento de infecções dermatológicas causadas por *S. aureus* incluindo os multirresistentes, MRSA [*S. aureus* meticilina resistente (RODE et al., 1991)]. Seu mecanismo de ação

concentra-se na inibição da síntese protéica e síntese de RNA (LEISINGER; MARGRAFF, 1979).

Outro composto com ação antibiótica é a pioluteorina, isolada pela primeira vez em 1950 de uma cultura de *P. aeruginosa* (TAKEDA, 1958) e posteriormente de outras espécies de *Pseudomonas* (BENCINI; HOWELL; WILD, 1983; BENDER; RANGASWAMY; LOPER, 1999). Este composto é tóxico para oomicetos, algumas bactérias e fungos (GROSS; LOPER, 2009).

As fenazinas compõe uma grande família que apresenta atividade antibiótica e antiparasitária, além de atividade antitumoral (GROSS; LOPER, 2009). Seu amplo espectro de ação está relacionado à sua interação com nucleotídeos, inibição da topoisomerase e liberação de radicais livres, sendo as principais espécies produtoras *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, e *P. fluorescens* (MAVRODI; BLAKENFELDT; THOMASHOW, 2006).

O 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) está associado ao controle dos fitopatógenos, apresentando efeito antibiótico em bactérias (KEEL et al., 1992), fungos (KEEL et al., 1990; KEEL et al., 1992) e helmintos (CRONIN et al., 1997).

A pirrolnitrina é um composto pirólico descoberto em *P. pyrocinia* em 1964 (ARIMA et al., 1964). Desde então sua produção por outras espécies e outros gêneros já foi reportada, e inclui *Enterobacter agglomerans*, *Myxococcus fulvus*, *Burkholderia* sp., e *Serratia* sp. (GERTH et al., 1982; HAMMER et al., 1999; COSTA et al., 2009). É um potente antifúngico, atuando na cadeia respiratória deste microrganismo (SUMINORI et al., 1986; TAWARA et al., 1989). Age no controle de fungos dermatofíticos, especialmente contra membros do gênero *Trichophyton* (LEISINGER; MARGRAFF, 1979).

CONCLUSÃO

A multirresistência bacteriana reflete em danos irreparáveis à saúde humana. As falhas terapêuticas geradas pela escassez de fármacos eficientes contra os mecanismos de resistência bacteriana refletem diretamente no aumento da mortalidade pelas infecções relacionadas à assistência à saúde.

A preocupante resistência aos carbapenêmicos, uma das últimas opções terapêuticas contra infecções Gram-negativas resistentes deve-se principalmente à disseminação de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC.

Em vista do reduzido número de antimicrobianos eficientes para o controle das infecções causadas por esta bactéria, é emergencial a busca por novas alternativas terapêuticas antimicrobianas.

Em vista do grande arsenal metabólico de *P. aeruginosa*, e sua notoriedade na produção de metabólitos secundários biologicamente importantes, esta espécie tem potencial na pesquisa por novos fármacos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ANDERL, J.N.; FRANKLIN, M.J.; STEWART, P.S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 7, p. 1818-1824, 2000.
- ANWAR, H.; STRAP, J.L.; COSTERTON, J.W. Kinetic interaction of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with cephalexin and tobramycin in a chemostat system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, p. 890-893, 1992.
- ARIMA, K. et al. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo*, v. 28, p. 575-576, 1964.
- BANKS, G.T. et al. Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature*, v. 234, p. 416-417, 1971.
- BENCINI, D.; HOWELL, C.R.; WILD, J.R. Production of phenolic metabolites by a soil pseudomonad. *Soil Biology Biochemistry*, v. 15, p. 491-492, 1983.
- BENDER, C.L.; RANGASWAMY, V.; LOPER, J.E. Polyketide production by plant-associated *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, v. p. 175-196, 1999.
- BERDY, J. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Advanced Applied Microbiology*, v. 18, p. 309-406, 1974.
- BERGSTROM, S.; THEORELL, H.; DAVIDE, H. On a metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea*. pyolipic acid, active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Ark. Kemi Mineral Geol*, v. 23A, p. 1-12, 1947.
- BERKADA, B. Preliminary report on warfarin for the treatment of herpes simplex. *Journal of the Irish Colleges of Physicians Surgeons*, v. 22, sup. 56, 1978
- BIBB, M.J. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, p. 208-215, 2005.
- BIRADAR, Y.S. et al. Exploring of antimicrobial activity of Triphala Mashī—an ayurvedic formulation. *Ecam*, v. 5, n, 1, p. 107-113, 2008.
- BORER, A. et al. Attributable mortality rate for carbapenem - resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 30, n. 10, p. 972-976, 2009.
- BORRIS, R.P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p. 29-38, 1996.
- BOUCHER, H.W. et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, p.1-12, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Epidemiologia para o controle de infecção hospitalar. Caderno A. Brasília: ANVISA; 2000. Disponível em: <<http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/CIHCadernoA.pdf>>. Acesso em 01 nov. 2013.

BRATU, S. et al. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, p. 972-975, 2007.

BRATU, S. et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. A new treat to our antibiotic armamentarium. *Archives of Internal Medicine*, v. 165, p. 1430-1435, 2005a.

BRATU, S. et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 3018-3020, 2005b.

BRATU, S. et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, p. 128-312, 2005c.

BRISSE, S.; VERHOEF, J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 915-924, 2001.

CAO, Y.; ZHANG, S.Y.; ZHU, R.H. Investigation of anti-fungal effects by wild plant *Zingiber Corallinum hance* and its clinical therapeutic effect. *Chinese Journal of Dermatology and Venereology*, v. 22, p. 103-105, 1989.

CASTANHEIRA, M. et al. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p.570-573, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotic Resistance Threats in the United States, Atlanta: CDC; 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Department of Health and Human Services. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings. Atlanta: CDC; 2006.

CHAUHAN, R.; ABRAHAM, J. In vitro antimicrobial potential of the lichen *Parmotrema* sp. extracts against various pathogens. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, v. 16, n. 7, p. 881-885, 2013.

CHEN, L.F.; ANDERSON, D.J. PATERSON, D.L. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Journal of Infection and Drug Resistance*, v. 5, p. 133-141, 2012.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*, v. 24, p. 1541-1550, 2006.

CORREA; L. et al. A hospital-based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infectious Diseases*, v. 13, p. 80, 2013.

COSTA R. et al. Genomics of pyrrolnitrin biosynthetic loci: evidence for conservation and whole-operon mobility within Gram-negative bacteria. *Environmental Microbiology*, v. 11, p. 159-175, 2009.

COSTERTON, J.W. et al. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, v. 49, p. 711-745, 1995.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRONIN, D. et al. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol *Pseudomonas* strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 63, p. 1357-1361, 1997.

DAROUICHE, R.O. et al. Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *Journal of Infectious Diseases*, v. 170, p. 720-723, 1994.

DE BOLLE, M.F. et al. Antimicrobial properties from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*, v. 31, p. 993-1008, 1996.

DEVASAHAYAM, G.; SCHELD, W.M.; HOFFMAN, P.S. Newer antibacterial drugs for a new century. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 19, n. 2, p. 215-234, 2010.

EMMERICH, R.; LÖW D. Bakteriolytische enzyme als ursache der erworbenen immunität und die heilung von infektionskrankheiten durch dieselben. *Z. Hyg. Infektionskrankh.*, v.31, p.1-65, 1899.

ENDIMIANI, A. et al. Characterization of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, p.427-437, 2009.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL / EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Joint Technical Report. The bacterial challenge: time to react. Updated September 2009. Disponível em : <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/antimicrobial_resistance/EMEA-576176-2009.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2013.

FALAGAS, M.E.; BLIZIOTIS, I.A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 29, p. 630-636, 2007.

FALAGAS, M.E. et al. A. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case control study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 60, p. 1124-1130, 2007.

FINCH, R.; HUNTER, P. A. Antibiotic resistance - action to promote new technologies: report of an EU Intergovernmental Conference held in Birmingham, UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 58, s. S1, p. i3-i22, 2006.

FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, v. 325, p. 1089-1093, 2009.

FREIBURGHAUS, F. et al. Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 55, p. 1-11, 1996.

FRIMMERSDORF, E. et al. How *Pseudomonas aeruginosa* adapted to various environments: a metabolomics approach. *Environmental Microbiology*, v. 12, n.6, p. 1734-1747, 2010.

GAUTAM, R.; SAKLANI, A.; JACHAK, S.M.; Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, p. 200-234, 2007.

GERTH, K. et al. Pyrrolnitrin from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *Journal of Antibiotics*, v. 35, p. 1101-1103, 1982.

GROSS, H.; LOPER, J.E. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural Product Reports*, v. 26, p. 1408-1446, 2009.

HAFIDH, R.R. et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The Open Microbiology Journal*, v. 5, p. 96-106, 2011.

HAMMER P.E. et al. Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. *FEMS Microbiology Letters*, v. 180, p. 39-44, 1999.

HAYS, E.E. et al. Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Chemical Biology*. v. 159, p. 725-750, 1945.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 205-215, 1996.

HOBSON, K.; BONTEN, M. J. M.; JARVIS, W. R. Nosocomial pneumoniae in mechanically ventilated patients receiving anti-acid, ranitidine, or sucralfate as prophylaxis for stress ulcer: a randomized controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, v.120, p.653-662, 1996.

HOIBY, N. Antibiotic therapy for chronic infection of *Pseudomonas* in the lung. *Annual Review of Medicine*, v. 44, p. 1-10, 1993.

HUGHES, J.; MELLOWS, G. Interaction of pseudomonic acid A with *Escherichia coli* B isoleucyl-tRNA synthetase. *Journal of Antibiotic*, v. 31, p. 330-335, 1978.

HUMPHRIES, R.M. et al. Successful treatment of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* pneumonia and bacteraemia with a combination of high-dose tigecycline and colistin. *Journal of Medical Microbiology*. v. 59, p. 1383-1386, 2010.

HUSSEIN, K. Carbapenem resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolates: risk factors, molecular characteristics, and susceptibility patterns. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 30, p. 666-671, 2009.

INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Bad Bugs, No Drugs: As Antibiotic Discovery Stagnates. A Public Health Crisis Brews, July, 2004.

IMS Global Pharmaceutical Market Forecast, 2008. IMS Health, Plymton Meeting, PA. 2008.

INWEREGBU, K.; DAVE, J.; PITTARD, A. Nosocomial infections. *Critical Care & Pain*, v. 5, n. 1, p. 14-7, 2005.

JENSEN, E.T. et al. Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infection and Immunity*, v. 58, p. 2383-2385, 1990.

KAZMI, M.H. et al. An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. *Phytochemistry*, v. 36, p. 761-763, 1994.

KEEL, C. et al. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant Microbe Interaction*, v. 5, p. 4-13, 1992.

KEEL, C. et al. Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4- diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco .*Symbiosis*, v. 9, p. 327-341, 1990.

KHARDORI, N. Antibiotics – Past, Present and Future. *Medical Clinics of North America*, p. 1049-1076, 2006.

KIM, S. et al. A simple colorimetric method for testing antimicrobial susceptibility of biofilmed bacteria. *The Journal of Microbiology*, v. 48, n. 5, p. 709-711, 2010.

KING, S.R.; TEMPESTA, M.S. From shaman to human clinical trials: the role of industry in ethnobotany, conservation and community reciprocity. *Ciba Foundation symposium*, v. 185, p. 197-206, 1994.

KLEVENS, R.M. et al. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Reports*, v. 122, n. 2, p. 160-166, 2007.

LEISINGER, T.; MARGRAFF, R. Secondary Metabolites of the Fluorescent *Pseudomonas*. *Microbiological Reviews*, v. 4, n. 3, p. 422-442, 1979.

LEVIN, A.S. et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 28, p. 1008-1011, 1999.

LIGHTBOWN, J.W.; JACKSON, F.L. Inhibition of cytochrome systems of heart muscle and certain bacteria by the antagonists of dihydrostreptomycin: 2-alkyl-4-hydroxyquinoline N-oxides. *Biochemistry*, v. 63, p. 130-137, 1956.

LIM, L.M. et al. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy*, v. 30, n. 12, p. 1279-1291, 2010

LIVERMORE, D.M.; Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean Journal of Internal Medicine*, v. 27, p. 128-142, 2012.

LIVERMORE, D.M. British Society for Antimicrobial chemotherapy working party on the urgent need: regenerating antibacterial drug discovery and development. discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 1941-1944, 2011.

LYCZAK, J.B.; CANNON, C.L.;PIER, G.B. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, p. 194-222, 2002.

MARCHAIN, D, et al. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 1413-1418, 2008.

MACLEOD, S.M.; STICKLER, D.J. Species interactions in mixed-community crystalline biofilms on urinary catheters. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, p. 1549-1557, 2007.

MCKENNA, M. The last resort: Health officials are watching in horror as bacteria become resistant to powerful carbapenem antibiotics — one of the last drugs on the shelf. *Nature*, v. 499, p. 394-396, 2013.

MARTÍNEZ, J. et al. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. *International Microbiology*, v. 7, p. 261-268, 2004.

MARTINO, P. et al. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in Microbiology*, v. 154, n. 9-16, 2003.

MAVRODI, D.V.; BLAKENFELDT, W.; THOMASHOW L.S. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annual Review Phytopathology*, v. 44, p. 417-445, 2006.

MEAGHER, A.K. et al. The pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of tigecycline. *Clinical Infectious Diseases*, v. 41, s. 5, p. S333-S40, 2005.

MELO-SILVEIRA, R.F. et al. In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by Xylan extracted from corn cobs. *International Journal of Molecular Sciences*, v.13, p. 409-426, 2012.

MICHAIL G. et al. Activity of tigecycline in combination with colistin, meropenem, rifampin, or gentamicin against KPC-producing *Enterobacteriaceae* in a murine thigh infection model. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 57, n. 12, p. 6028-6033, 2013.

MUNOZ-PRICE, L.S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infectious Diseases*, v.13, p. 785–796. 2013.

MUNOZ-PRICE, L.S.; QUINN, J.P.; The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: a tale of strains, plasmids, and transposons. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, p. 1739-1741, 2009.

MONTEIRO, J. et al. First report of KPC- 2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 333-334, 2009.

MONTERO, A. et al. Efficacy of colistin versus β -lactams, aminoglycosides, and rifampin as monotherapy in a mouse model of pneumonia caused by multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 1946-1952, 2002.

MURALIDHARAN, G. et al. Effects of age and sex on single-dose pharmacokinetics of tigecycline in healthy subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 1656-1659, 2005a.

MURALIDHARAN, G. et al. Pharmacokinetics of tigecycline after single and multiple doses in healthy subjects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 220-229, 2005b.

NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 1257-1263, 2008.

NAVON-VENEZIA, S. et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC- 3–producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 53, p. 818-820, 2009.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-477, 2007.

NGUYEN, M. et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: factors correlated with clinical and microbiologic outcomes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 67, p. 180-184, 2010.

NIÑO, J.; MOSQUERA, O.M.; CORREA, Y.M. Antibacterial and antifungal activities of crude plant extracts from Colombian biodiversity. *Revista de Biología Tropical*, v. 60, n. 4, p. 1535-1542, 2012.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infectious Disease*, v. 9, p. 228-326, 2009.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 10, p.229-236, 2011.

PATEL, G. et al. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 29, p.1099-1106, 2008.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E.M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 2702, 2009.

PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, p. 265-268, 2009.

PERES, M.T.L.P. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 56, p. 223-226, 1997.

PHILLIPSON, J.D.; O'NEILL, M.J. New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. *Acta Pharmaceutica Nordica*, v. 1, p. 131-144, 1987.

PILLAI, D.R. et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, v. 15, n. 5, p. 827-829, 2009.

PODSCHUN, R.; ULLMANN U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 4. p. 589-603, 1998.

QURESHI, Z.A. et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 2108-2113, 2012.

RANKOVIC, B.R.; KOSANIC, M.; STANOJKOVIC, T.P. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 11, p. 97, 2011.

RICE, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *Journal Infectious Diseases*, v. 197, p. 1079-1081, 2008.

ROBERTS R.R, et al. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship. *Clinical Infectious Diseases*. v. 49, n. 8, p. 1175-1184, 2009.

RODE, H. et al. Mupirocin resistance. *Lancet*, v. 338, p. 578, 1991.

RODVOLD, K.A. et al. Serum, tissue and body fluid concentrations of tigecycline after a single 100 mg dose. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, p. 1221-1229, 2006.

ROKEM, J.S.; LANTZ, A.E.; NIELSEN, J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Natural Product Reports*, v. 24, p. 1262-1287, 2007.

SAKANAKA, S. et al. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 53, p. 2307-2311, 1989.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SHANKS, R.M.Q. et al. Isolation and identification of a bacteriocin with antibacterial and antibiofilm activity from *Citrobacter freundii*. *Archives of Microbiology*, v. 194, n. 7, p. 575-587, 2012.

SIMONETTI, P.; GARDANA, C.; PIETTA, P. Plasma levels of caffeic acid and antioxidant status after red wine intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 5964-5968, 2001.

SIEVERT, D.M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 34, n. 1, p. 2-14, 2013.

SILBY, M.W.; et al. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 35, p. 652-680, 2011.

SILVA, R.M.; TRAEBERT, J.; GALATO, D. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*: a review of epidemiological and clinical aspects. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 12, n. 6, p. 663-671, 2012.

SONNLEITNER, E. et al. Novel targets of the CBRAB/CRC carbon catabolite control system revealed by transcript abundance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE*, v. 7, n. 10, p. 1-11, 2012.

SOULI, M. et al. An outbreak of infection due to beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clinical Infectious Diseases*, v. 50, p. 364-373, 2010.

SPELLBERG, B. The Infectious Diseases Society of America's (IDSA) Statement on antibiotic resistance: promoting critically needed antibiotic research and development and the appropriate use ("stewardship") of these precious drugs. before the House Committee on Energy and Commerce Subcommittee on Health. June, 2010.

STAHLHUT, S.G. et al. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, v. 65, p. 350-359, 2012.

STERN, J.L. et al. Phlorotannin-protein interactions. *Journal of Chemical Ecology*, v. 22, p. 1887-1899, 1996.

STOVER, C.K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, v. 406, p. 959-964, 2000.

STRAUSBAUGH, L.J.; SANDE, M.A.; Factors influencing the therapy of experimental *Proteus mirabilis* meningitis in rabbits. *Journal of Infectious Diseases*, v. 137, p. 251-260, 1978.

SUMINORI, U. et al. Antifungal composition employing pyrrolnitrin in combination with an imidazole compound. *European Patent Application*, 1986.

TAKEDA, R. Structure of a new antibiotic, pyoluteorin. *Journal of America Chemotherapy Society*, v. 80, p. 4749-4750, 1958.

TALBOT, G.H. et al. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 42, p.657-668, 2006

TAWARA, S. et al. In vitro antifungal synergism between pyrrolnitrin and clotrimazole. *Japanese Journal of Medical Mycology*, v. 30, p. 202-210, 1989.

TERRAS, F.R.G. et al. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiology*, v. 103, p. 1311-1319, 1993.

TENOVER F.C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clinical Infectious Diseases*, v. 33, p. S108-S115, 2001.

THOMSON, K.S. Extended-spectrum β -lactamase, AmpC and carbapenemase issues. *Journal Clinical Microbiology*, v.48, p.1019-1025, 2010.

THORNES, R.D.. Clinical and biological observations associated with coumarins, p. 256. In O'Kennedy, R.; Thornes, R. D. *Coumarins: biology, applications and mode of action*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.

TODA, M. et al. The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O1. *Microbiology and Immunology*, v. 36, p. 999-1001, 1992.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. Ed. Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, 2008.

TRANSATLANTIC TASKFORCE ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. TATFAR. Recommendations for future collaboration between the U.S. and EU, 2011

TSUCHIYA, H. et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacol*, v. 50, p. 27-34, 1996.

TUMBARELLO M. Et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 55, p. 943-590, 2012.

VIJAYA, K.; ANANTHAN, S.; NALINI, R. Antibacterial effect of the flavin, polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp.—a cell culture study. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 49, p.115-118, 1995.

VRANY, J.D.; STEWART, P.S.; SUCI, P.A. Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 1352-1358, 1997.

WAGNER, C.; SAUERMAN, R.; JOUKHADAR, C. Principles of antibiotic penetration into abscess fluid. *Pharmacology*, v. 78, p. 1-10, 2006.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HIBY, N. Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 60, p. 470-482, 2007.

WILLIAMS, P.; TOMAS, J. M. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Reviews of Medical Microbiology*, v.1, p.196-204, 1990.

WONG, W.R.; OLIVER, A.G.; LININGTON, R.G. Development of antibiotic activity profile screening for the classification and discovery of natural product antibiotics. *Chemistry & Biology*, v. 19, p. 1483-1495, 2012.

YANG, C. et al. The inhibitory effect of *Zingiber corallinum* Hance essential oil on drug-resistant bacteria and evaluation of its acute toxicity. *Medical Science Monitor Basic Research*, v. 17, n. 5, p. 139-146, 2011.

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

ZAGORIANOU, A. et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *European surveillance*, v. 17, n. 7, p. 1-7, 2012.

ZHANG, R.Y.; YU, D.S.; Research and progress in traditional plant *Zingiber Corallinum* Hance. *Journal of Sichuan Traditional Chinese Medicine*, v. 22, p. 26-28, 2004.

ZAOUTIS, T.E. Antibiotic Resistance – Who will pay the bills? *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, n. 8, p.1185-1186, 2009.

ZARKOTOU, O. et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clinical Microbiology Infected*, v. 17, p. 1798-803, 2011.

ARTIGO

Atividade antibiótica de metabólito secundário produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC

Gilselena Kerbauy¹; Ana Carolina Pollano Vivan²; Cleverson Barbosa de Lima²; Ane Stefano Simionato²; Marsileni Pelisson³; Eliana Carolina Vespero³ Celia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade⁴; Daiani Moreira Barbieri⁴; João Carlos Palazzo Mello⁵; Alexandre Tadachi Morey²; Lucy Megumi Yamauchi²; Sueli Fumie Yamada-Ogatta²; Admilton Gonçalves de Oliveira²; Galdino Andrade².

¹ Universidade Estadual de Londrina, CCS, Department of Nursing, Londrina - PR, Brazil.

² Universidade Estadual de Londrina, CCB, Department of Microbiology, Londrina - PR, Brazil.

³ Universidade Estadual de Londrina, CCS, Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicological Microbiology, Londrina - PR, Brazil.

⁴ Universidade Estadual de Londrina, CCB, Department of Biology, Londrina - PR, Brazil.

⁵ Universidade Estadual de Maringá, Department of Pharmaceutical Science, Maringá - PR, Brazil.

Resumo

Os microrganismos resistentes aos antimicrobianos são o grande desafio da medicina e resultando em uma perda importante para a saúde humana em todo o mundo. As limitações terapêuticas no controle das infecções por *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC é um grande problema que resulta em altas taxas de morbidade e mortalidade. É evidente a urgente necessidade de pesquisas por novos compostos eficazes no controle destas infecções. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibiótica da fração F3d obtida do metabolismo secundário da *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtoras da enzima KPC. Os resultados mostraram que a concentração inibitória mínima da fração F3d foi 62,5 µg/mL e após 14 horas de inoculação, nenhuma célula viável foi detectada. Atividade antibiofilme também foi observada no tratamento com a concentração inibitória mínima da F3d por 24 horas. Células planctônicas ou sésseis da cepa representativa de *Kpn*-KPC apresentaram significativas alterações morfológicas na parede após inoculação com a fração F3d.

Palavras-chave: Produtos Naturais, *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, Atividade antibiótica.

Abstract

The multidrug resistant organisms are the major challenge of medicine and resulting in an important loss for human health around the world. The limitations of patients therapeutic to control *Klebsiella pneumoniae* KPC-producing infection is a great problem that resultingt in a high morbidity and mortality rates. It is clear the urgent need of new and more efficacious compounds to control infections caused by *K. pneumoniae* KPC-producing. The aim of this study was evaluate the antibiotic activity of F3d fraction obtained from secondary metabolite produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against clinical isolates of *K. pneumoniae* KPC-producing. The results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of F3d fraction was $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ and after 30 min. to 24 h did not grow any cells in the treated culture with this concentration inoculated. In the fluorescent viability test the rate of died cells was bigger than live after 8 h treated with F3d fraction. Also the MIC concentration of F3d fraction showed high activity against biofilm produced by *K. pneumoniae* KPC-producing after 24 h/37 °C. Planktonic and biofilm cells treated with F3d fraction appeared with pronounced morphological alterations on the wall

Key words: Natural product synthesis, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing, Antibiotic activity.

Introdução

Os microrganismos multirresistentes desafiam o tratamento das infecções, resultando em danos irreparáveis para a saúde humana em todo o mundo (TALBOT et al., 2006; SPELLBERG, 2010; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

De acordo com o *Centers for Disease Control and Preventions* (CDC), aproximadamente 2 milhões de infecções e 23 mil mortes são causadas por microrganismos multirresistentes, e o custo total da resistência antimicrobiana pode chegar a 20 bilhões de dólares ao ano nos Estados Unidos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). Este elevado custo no controle destas infecções é justificado pelo uso de antimicrobianos de última geração, consequentemente mais caros, e pelo elevado período de hospitalização dos pacientes com infecções de difícil tratamento (ROBERTS et al., 2009).

Estima-se que mais de 70% das bactérias envolvidas nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobianos convencionalmente usados na prática clínica (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2004).

Como exemplo, a resistência bacteriana aos carbapenêmicos, classe de antimicrobianos que representa uma das últimas opções terapêuticas contra infecções graves causadas por patógenos Gram-negativos resistentes (FALAGAS; BLIZIOTIS, 2007). Essas bactérias podem apresentar vários mecanismos de resistência, como alteração na permeabilidade de porinas na membrana externa, alteração do sítio alvo dos antimicrobianos, efluxo e a produção de enzimas que

degradam a molécula antimicrobiana, como as β -lactameses e carbapenemases (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

A produção da enzima carbapenemase é um dos mecanismos mais importantes na resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, predominantemente encontrada em *Klebsiella pneumoniae*, e por isso a denominação *K. pneumoniae* carbapenemase - KPC (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; LIVERMORE, 2012). Esta espécie bacteriana é um importante patógeno humano, responsável por considerável número de IRAS, e tem como infecções mais frequentes as do trato urinário associadas a cateter vesical, da corrente sanguínea associada a cateteres vasculares e a pneumonia associada à ventilação mecânica (BORER et al., 2009; SIEVERT et al., 2013).

O manejo terapêutico de pacientes com infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora da enzima KPC (*Kpn*-KPC) é extremamente desafiador. As polimixinas, incluindo a colistina e a tigeciclina são as poucas alternativas terapêuticas para pacientes com essas infecções, entretanto, elevados índices de nefrotoxicidade estão associados às polimixinas (LIM et al., 2010) e a monoterapia com tigeciclina nem sempre é efetiva (MICHAIL et al., 2013). Somado a isso, crescente resistência a colistina vem sendo documentada em muitos países. Essa pan-resistência, como é conhecida, resulta em elevadas taxas de mortalidade (ZAOUTIS, 2009; BORER et al., 2009; HUMPHRIES et al., 2010; ZARKOTOU et al., 2011; TUMBARELLO et al., 2012; QURESHI et al., 2012).

Diante desta situação, respeitadas instituições mundiais alertam para o reduzido número de patentes de novos fármacos antimicrobianos contrastando com o aumento de mortes por infecções multirresistentes (INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2004; TALBOT et al., 2006; FINCH; HUNTER, 2006;

SPELLBERG, 2010), deixando evidente a necessidade de pesquisas envolvendo o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos para tratamento das infecções causadas por *Kpn-KPC* (FINCH; HUNTER, 2006; ; TALBOT et al., 2006; SPELLBERG, 2010).

Espécies de *Pseudomonas* produzem um amplo espectro de metabólitos secundários, alguns com atividade antibiótica (GROSS; LOPER, 2009). Neste sentido, a atividade antibiótica de compostos extracelulares produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* no controle de *Xanthomonas citri* (OLIVEIRA et al., 2011) e *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (CARDOZO et al., 2013) tem sido mostradas pelo nosso grupo de pesquisa. Neste estudo, foi reportado a atividade antibiótica de metabólitos secundários produzidos por *P. aeruginosa* cepa LV contra células planctônicas e biofilme formado por isolados clínicos de *Kpn-KPC*.

Material e métodos

Cepas bacterianas

Um total de 19 isolados clínicos de *Kpn*-KPC, isolados de diferentes materiais clínicos e pacientes hospitalizados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, apresentado na tabela 1, seguiu critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2013). A cepa *K. pneumoniae* ATCC 10031 foi usada como controle não produtor de carbapenemase. O gene *bla*_{KPC}, responsável pela produção da enzima KPC, foi detectado pela técnica de PCR de acordo com Bradford et al. (2004). As cepas foram estocadas a -20 °C em caldo triptona (Tryptic Soy Broth, TSB) contendo 40% de glicerol e 1 µg/mL de ertapenem.

A cepa produtora do metabólito secundário com atividade antibiótica, *P. aeruginosa* cepa LV, foi isolada de uma lesão de cancro cítrico em fruto da laranja [*Citrus sinensis* cv. Valence (RAMPAZO et al., 2004)]. A cepa foi mantida a -20 °C em caldo nutrient contendo 40% de glicerol.

Isolamento e purificação da fração F3d produzida por P. aeruginosa cepa LV

A fração F3-acetate de etila (F3d) foi obtida do sobrenadante da cultura de 15 dias de *P. aeruginosa* cepa LV cultivada em meio suplementado com 100 mg/mL de CuCl₂.2H₂O, de acordo com a patente de produção (INPI PI0803350-1; Oliveira et al. 2011). Solução estoque da fração F3d foram preparadas com DMSO 10% na concentração de 10 mg/mL e adicionada asépticamente em meio de crescimento em diferentes concentrações para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A concentração final do DMSO não ultrapassou 1%. Para

realização do teste de disco difusão, a mesma solução foi utilizada para impregnar os discos de papel com 250 µg de F3d.

Teste de citotoxicidade

A linhagem celular LLCMK₂ foi cultivada em placas de 96 poços (Techno Plastic Products, Switzerland) contendo caldo RPMI suplementado com soro bovino 10% na densidade de 2.5×10^4 células/poço por 24 horas em 5% de CO₂. Na sequência, células não aderentes foram removidas por lavagem com solução estéril de PBS (0.15 M phosphate-buffered saline PH 7.2). Meio contendo diferentes concentrações de F3d (2,000 – 1 µg mL⁻¹) foi adicionado em cada poço, e as placas incubadas por 72 horas nas mesmas condições descritas. A viabilidade celular foi determinada pela técnica de oxirredução do MTT [brometo de dimethylthiazol diphenyl tetrazolium (Sigma Chemical Co, USA)] de acordo com recomendações do fabricante. Poços contendo apenas meio ou meio suplementado com 1% de DMSO foram utilizados como controle de crescimento e esterilidade, respectivamente. O cálculo da concentração citotóxica considerou concentração de F3d necessária para reduzir 50% das células (CC₅₀).

Efeito da fração F3d contra células planctônicas

Primeiramente, a susceptibilidade antibacteriana dos 19 isolados clínicos de *Kpn*-KPC à fração F3d foi determinada pelo teste de disco difusão usando 250 µg por disco. Sete cepas representativas com diferentes genótipos e uma cepa controle (*K. pneumoniae* ATCC 10031) foram selecionadas para determinação da CIM de Fd3 pelo método de microdiluição. Técnica de diluição seriada foi utilizada para distribuição de diferentes concentrações da fração F3d (500 – 1.9 µg/mL) em placas de poliestireno estéreis de 96 poços contendo caldo Mueller-Hinton (Becton Dickinson, USA) cátion ajustado. Após 18 horas de incubação, a viabilidade bacteriana foi analisada pela técnica de oxiredução do TTC [2, 3, 5-triphenyl-2H tetrazolium chloride (Sigma-Aldrich/USA)]. Aproximadamente 50 µL da solução de TTC 0.02% foi adicionada em cada poço e as placas incubadas por 1 hora a 37 °C. Após incubação, a densidade óptica a 590 nm foi avaliada em leitor de microplacas (Synergy™ HT, Biotek®). Poços contendo apenas meio ou crescidos de DMSO 0,02% foram utilizados como controles. A CIM foi determinada pela inibição de 100% das células. Ambos os métodos seguiram as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Para detectar o tempo de morte provocada pela fração F3d, células planctônicas da cepa *Kpn*-KPC3 foram testadas na concentração de 62,5 µg/mL da fração em diferentes tempos (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 14 e 24 horas). A viabilidade celular também foi determinada usando TTC como descrito anteriormente. Para confirmar a morte bacteriana, 25 µL das culturas dos poços foram assepticamente transferidas para placas contendo ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37 °C por 24 horas. Concomitantemente, a viabilidade das células planctônicas, tratadas ou não com F3d (62,5 µg/mL por 1, 8 e 14 horas), foi avaliada usando o kit BacLight LIVE/DEAD (Molecular Probes) de acordo com as

recomendações do fabricante. Células bacterianas foram dispostas em lamínas de vidro e analisadas por microscópio de fluorescência (Leica, DM2000). Todos os testes foram realizados em triplicata, em três diferentes ocasiões.

Efeito da fração F3d na viabilidade do biofilme

Lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, esterilizadas, previamente tratadas com solução de ácido acético 1%, foram assepticamente dispostas nos poços de uma placa de poliestireno com 24 poços (Techno Plastic Products, Switzerland). A cepa *Kpn-KPC3* foi previamente cultivada a 37 °C por 18 horas em caldo TSB. A densidade celular da cultura foi ajustada para 0.5×10^8 UFC/mL no mesmo meio e 2 mL da suspensão celular foi transferida para cada poço. A placa foi incubada estaticamente em condições aeróbicas a 37 °C por 24 horas. Passado o período de incubação, o sobrenadante foi aspirado e a lamínula lavada três vezes com solução salina 0,85% esterilizada. Após a remoção das células não aderentes, 200 µL do caldo TSB contendo 62,5 µg/mL da fração F3d foi adicionada e a placa incubada por 24 horas na mesma condição anterior. Os controles foram determinados pela solução da fração livre de células, e pelo biofilme formado na lamínula livre da fração antibiótica. A viabilidade das células sésseis foi avaliada usando o kit BacLight LIVE/DEAD como descrito anteriormente.

Análise das alterações morfológicas bacterianas provocadas pela fração F3d

Para determinar o efeito da fração F3d na morfologia e arquitetura do biofilme, células planctônicas e sésseis da cepa *Kpn-KPC3* foram processadas e tratadas com 62,5 µg/mL da fração como descrito previamente, exceto o tratamento das lâminulas de vidro, que para esse experimento foram previamente revestidas

com solução de poli-L-lisina 30% para análise do biofilme. Celulas tratadas e não tratadas foram fixadas com tampão fosfato (0.1 M) e glutaraldeído (4%) por 12 horas a 4 °C e pós fixadas em 1% de OsO₄ por 1 hora. O material fixado foi desidratado em diferentes gradientes de etanol (70, 80, 90 and 100 °GL), atingido o ponto crítico com CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), coberto com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e examinado em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

Resultados

Atividade antibiótica contra isolados clínicos de K. pneumoniae produtores de carbapenemases e citotoxicidade em células de mamíferos

A atividade antibiótica da fração F3d obtida do metabolismo secundário de *P. aeruginosa* foi primeiramente analizado por método de disco difusão contra 19 isolados clínicos de *Kpn*-KPC classificados em 5 genótipos diferentes de acordo com o resultado do PFGE, e uma cepa controle sensível aos carbapenêmicos. Todos os isolados clínicos apresentava resistência aos carbapenêmicos imipenem, ertapenem e meropenem, e a presença do gene *blaKPC* foi confirmada pela técnica de PCR. A fração F3d mostrou atividade entibiótica contra todas as cepas testadas, e o diâmetro do halo de inibição variou de 12 a 23 mm (Tabela 1). Nenhum efeito antibiótico foi observado no disco controle contendo apenas diclorometano, o diluente da fração. O MIC da F3d para todos os isolados foi 62,5 µg/mL. A partir de 30 minutos de incubação do inóculo com a fração F3d na CIM, a multiplicação bacteriana não foi observada pela metodologia do TTC. Nenhum crescimento bacteriano em ágar Mueller-Hinton foi observado após 14 horas de incubação na

presença da fração. A fração F3d na CIM também inibiu o biofilme formado pela cepa representativa *Kpn-KPC3* após 24 horas de incubação.

Não foi possível determinar a concentração citotóxica de 50% da F3d para as células LLC-MK₂, tendo em vista que mesmo na concentração mais alta da fração (2.000 µg/ml) aproximadamente 84% das células de mamíferos permaneceram viáveis de acordo com o ensaio de viabilidade por MTT.

Efeito da fração F3d na viabilidade e morfologia bacteriana

O tempo-dependente do efeito de F3d na viabilidade celular também foi observado por microscopia de fluorescência. Após oito horas na presença de 62,5 µg/mL da fração F3d, a maioria das células foram impregnadas pelo corante vermelho-fluorescente, refletindo em morte bacteriana por danos na membrana, divergindo das células não tratadas que mantiveram as membranas íntegras, coradas de verde-fluorescente (Figura 1). Não foram detectadas células viáveis após 14 horas de tratamento, corroborando com o resultado do plaqueamento das culturas tratadas. O tratamento com a fração F3d provocou significativas alterações morfológicas da cepa representativa *Kpn-KPC3* observadas após uma hora do início da incubação com a fração (Figura 2).

A fração F3d provocou drástica redução no número de células viáveis no biofilme após 24 horas de incubação (dados não apresentados).

Discussão

O desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, potentes no controle das bactérias resistentes, é uma necessidade global. As investigações

acerca do uso terapêutico dos metabólitos secundários de *Pseudomonas* spp. data de 115 anos atrás, e a maioria dos metabólitos secundários produzidos por esse gênero de bactéria apresenta atividade antibiótica ou fitotóxica (LEISINGER; MARGRAFF, 1979). Neste estudo, a atividade antibiótica de metabólitos secundários produzidos por *P. aeruginosa* contra isolados clínicos de *Kpn*-KPC resistentes a colistina foram apresentados pela primeira vez, incluindo não apenas células planctônicas como aquelas imersas em matriz de biofilme.

As células bacterianas do biofilme estão imensas em uma matriz auto sintetizada de substância polimérica extracelular que aumenta a tolerância à ação antibiótica, complicando o tratamento de infecções bacterianas (HOYLE; COSTERTON, 1991; MAH; O'TOOLE, 2001). Desinfetantes e antibióticos tradicionais foram desenvolvidos por sua capacidade de matar ou inibir o crescimento de bactérias planctônicas, e elas são muitas vezes inativas contra biofilmes (SAMBANTHAMOORTHY et al., 2011).

Atividade antibiótica e antibiofilme de metabólitos secundários produzidos pela *P. aeruginosa* cepa LV tem sido mostrada contra o fitopatógeno *Xanthomonas citri* (OLIVEIRA et al., 2011). Em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina/oxacilina (MRSA), a fração F3d também mostrou atividade inibitória contra células planctônicas na concentração de 150 µg/mL da fração, entretanto atividade antibiofilme não foi avaliada (CARDOZO et al., 2013).

A presença do cobre em meio de cultura da cepa LV pode induzir a produção dos componentes antibióticos da fração F3d, tendo em vista que na ausência do mesmo, nenhum efeito inibitório é observado. Similarmente, Cain et al. (2000) mostraram que a presença do cobre induz a produção de metabólitos

antifúngicos por uma cepa de *Burkholderia* spp. isolada do solo, eficaz contra *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

Vários estudos tem relatado a atividade antibiótica de metabólitos com diferentes estruturas químicas produzidos por *Pseudomonas* spp., incluindo a fenazina e os derivados de indoles e piroles (LEISINGER; MARGRAFF, 1979). A fração F3d é composta prioritariamente por indolinona, fenazina e um organo metálico. Tendo em vista que tanto a fenazina quanto a indolinona não mostraram atividade antibiótica contra *Kpn*-KPC (dados não apresentados), provavelmente o organo metálico é o responsável pela inibição destes isolados clínicos.

O Salvarsan foi o primeiro organo metálico com atividade antibacteriana, introduzido em 1910 no tratamento da sífilis, uma infecção causada pelo *Treponema pallidum*. Tendo em vista os efeitos tóxicos do composto orgânico arsenico, o Salvarsan deixou de ter aplicabilidade terapêutica em 1940 (ZAFFIRI; GARDNER; TOLEDO-PEREYRA, 2012). Entretanto, vários compostos organo metálicos com atividade antimicrobiana, inclusive contra *K. pneumoniae*, tem sido descritos (BUDIGE et al., 2011; SOBHA; MAHALAKSHMI; RAMAN, 2012). Neste estudo, a fração F3d que contém um componente organo metálico parece ser mais seletiva para bactérias que para células do hospedeiro em vista do resultado do teste de citotoxicidade, indicando o seu potencial para o desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento de infecções causadas por *Kpn*-KPC e outras bactérias resistentes.

Conclusão

Os resultados deste estudo mostraram que os metabólitos secundários (fração F3d) produzidos por *P. aeruginosa* cepa LV tem atividade antibacteriana contra células planctônicas e biofilme formado por isolados clínicos de *Kpn*-KPC. Sua alta eficiência antibiótica e sua baixa citotoxicidade mostraram que este composto possui um ótimo potencial no desenvolvimento de novos antibióticos para o tratamento de infecções causadas por importantes bactérias patogênicas e resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado.

Reference

BORER, A. et al. Attributable mortality rate for carbapenem - resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 30, n. 10, p. 972-976, 2009.

BRADFORD, P.A. ; BRATU, S. ; URBAN, C. ; VISALLI, M. ; MARIANO, N. ; LANDMAN, D. ; RAHAL, J.J. ; BROOKS, S. ; CEBULAR, S. ; QUALE, J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the Class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York city. *Clinical Infectious Diseases*, v. 39, p.55–60, 2004.

BRADFORD, P.A. ; BRATU, S. ; URBAN, C. ; VISALLI, M. ; MARIANO, N. ; LANDMAN, D. ; RAHAL, J.J. ; BROOKS, S. ; CEBULAR, S. ; QUALE, J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the Class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York city. *Clinical Infectious Diseases*, v. 39, p.55–60, 2004.

BUDIGE, G, et al. Synthesis, characterization and biological evaluation of mononuclear Co(II), Ni(II), Cu(II) and Pd(II) complexes with new N2O2 Schiff base ligands *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, v. 59, n. 2, p. 166-171, 2011.

CAIN, C.C. et al. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 9, p. 4139–4141, 2000.

CARDOZO, V.F. et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. v. 12, n.12, p. 1-8, 2013

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Antibiotic Resistance Threats in the United States*, Atlanta: CDC; 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Wayne, PA: CLSI; 2013.

CORREA; L. et al. A hospital-based matched case–control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infectious Diseases*, v. 13, p. 80, 2013.

GROSS, H.; LOPER, J.E. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural Product Reports*, v. 26, p. 1408-1446, 2009.

HOYLE, B.D.; COSTERTON, J.W. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in Drug Research*, v. 37, p. 91–105, 1991.

HUMPHRIES, R.M. et al. Successful treatment of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* pneumonia and bacteraemia with a combination of high-dose tigecycline and colistin. *Journal of Medical Microbiology*. v. 59, p. 1383-1386, 2010.

INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. *Bad Bugs, No Drugs: As Antibiotic Discovery Stagnates. A Public Health Crisis Brews*, 2004.

LEISINGER, T.; MARGRAFF, R. Secondary Metabolites of the Fluorescent *Pseudomonas*. *Microbiological Reviews*, v. 4, n. 3, p. 422-442, 1979.

MAH, T.F.; O'Toole, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, v. 9, p. 34–39, 2001.

MUNOZ-PRICE, L.S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infection Diseases*, v.13, p. 785–796, 2013.

MUNOZ-PRICE, L.S.; QUINN, J.P.; The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: a tale of strains, plasmids, and transposons. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, p. 1739-1741, 2009.

OLIVEIRA, A.G. et al. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control*, v. 56, p. 125–131, 2011.

QURESHI, Z.A. et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 2108-2113, 2012.

RAMPAZO, L.G.L.,. Evaluation of the effect of biological agents and their products into the incidence of citrus canker lesions. 2004. 57 fls. Dissertation (Microbiology Master Degree) – Londrina State University, Londrina-PR, 2004.

ROBERTS R.R, et al. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship. *Clinical Infectious Diseases*. v. 49, n. 8, p. 1175-1184, 2009.

SIEVERT, D.M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 34, n. 1, p. 2-14, 2013.

SOBHA, S.; MAHALAKSHMI, R.; RAMAN, N. Studies on DNA binding behaviour of biologically active transition metal complexes of new tetradentate N2O2 donor Schiff bases: inhibitory activity against bacteria. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 15, n. 92, p. 175-183, 2012.

SPELLBERG, B. The Infectious Diseases Society of America's (IDSA) Statement on Antibiotic Resistance: Promoting Critically Needed Antibiotic Research and Development and the Appropriate Use ("Stewardship") of these Precious Drugs. Before the House Committee on Energy and Commerce Subcommittee on Health. 2010.

TALBOT, G.H. et al. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 42, p.657-668, 2006

TUMBARELLO M. et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 55, p. 943-590, 2012.

VIVAN, A.C.P. Molecular characterization and epidemiologic study of clinical isolates of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* at a university hospital. 2012. 89 fls. Dissertation (Microbiology Master Degree) – Londrina State University, Londrina-PR, 2012

ZAFFIRI, L.; GARDNER, J.; TOLEDO-PEREYRA, L.H. History of antibiotics from salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*, v. 25, n. 2, p. 67-77, 2012.

ZAGORIANOU, A. et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *European Surveillance*, v. 17, n. 7, p. 1-7, 2012.

ZAOUTIS, T.E. Antibiotic Resistance – Who will pay the bills? *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, n. 8, p.1185-1186, 2009.

ZARKOTOU, O. et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clinical Microbiology Infected*, v. 17, p. 1798-803, 2011.

Tabela 1 – Isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase KPC de acordo com o fenótipo de resistência e o halo de inibição provocado pela fração F3d

Strains	Phenotypic antimicrobial resistance	F3d Inhibition zones (mm)
<i>Kpn</i> -KPC1	imi, mpm, ert	20
<i>Kpn</i> -KPC2	imi, mpm, ert, pol B, col	19
<i>Kpn</i> -KPC3	imi, mpm, ert, pol B, col	23
<i>Kpn</i> -KPC4	imi, mpm, ert	19
<i>Kpn</i> -KPC5	imi, mpm, ert	15
<i>Kpn</i> -KPC6	imi, mpm, ert	15
<i>Kpn</i> -KPC7	imi, mpm, ert, pol B, col	18
<i>Kpn</i> -KPC8	imi, mpm, ert	16
<i>Kpn</i> -KPC9	imi, mpm, ert	15
<i>Kpn</i> -KPC10	imi, mpm, ert	17
<i>Kpn</i> -KPC11	imi, mpm, ert	23
<i>Kpn</i> -KPC12	imi, mpm, ert, pol B, col	15
<i>Kpn</i> -KPC13	imi, mpm, ert	20
<i>Kpn</i> -KPC14	imi, mpm, ert	18
<i>Kpn</i> -KPC15	imi, mpm, ert	15
<i>Kpn</i> -KPC16	imi, mpm, ert	20
<i>Kpn</i> -KPC17	imi, mpm, ert	19
<i>Kpn</i> -KPC18	imi, mpm, ert	12
<i>Kpn</i> -KPC19	imi, mpm, ert, pol B, col	20

Nota: imi, imipenem; mpm, meropenem; ert, ertapenem; pol B, polimixina B; col, colistina.

Figura 1 – Microscopia de Fluorescência: Ensaio de viabilidade com o kit BacLight Live/Dead do isolado clínico *Kpn*-KPC3 não tratado (A) e tratado com 62,5 µg/mL da fração F3d por 8 horas (B).

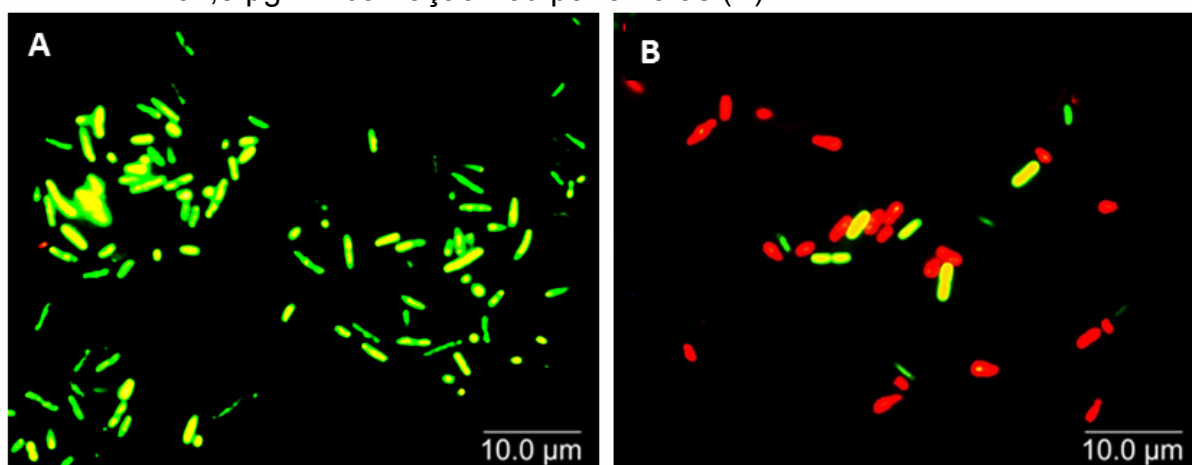


Figura 2 – Microscopia Eletrônica de Varredura do isolado clínico *Kpn*-KPC3 não tratado (A) e tratado com 62,5 µg/mL da fração F3d por 1 hora (B).

