

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA**

Thuanny Borba Rios

Prospecção de peptídeos antimicrobianos em solo do Cerrado e avaliação de antimicrobianos combinados no controle de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus in vitro*

Juiz de Fora

2020

Thuanny Borba Rios

Prospecção de peptídeos antimicrobianos em solo do Cerrado e avaliação de antimicrobianos combinados no controle de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* *in vitro*

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

Coorientadora: Dra. Angela Mehta

Juiz de Fora

2020

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rios, Thuanny Borba .

Prospecção de peptídeos antimicrobianos em solo do Cerrado e avaliação de antimicrobianos combinados no controle de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* in vitro / Thuanny Borba Rios. -- 2020.

73 f.

Orientador: Octávio Luiz Franco

Coorientadora: Angela Mehta

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2020.

1. Peptídeos . 2. Prospecção. 3. Sinergismo. I. Franco, Octávio Luiz, orient. II. Mehta, Angela , coorient. III. Título.


THUANNY BORBA RIOS

PROSPECÇÃO DE PEPTIDEOS ANTIMICROBIANOS EM SOLO DO CERRADO E
AVALIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS COMBINADOS NO CONTROLE DE *Escherichia coli*,
Klebsiella pneumoniae E *Staphylococcus aureus* IN VITRO

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 14/05/2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Octávio Luiz Franco
Orientador
Universidade Católica de Brasília



Dr.ª Angela Mehta
Co-orientadora
Embrapa



Prof.ª Dr.ª Simoni Campos Dias
Universidade Católica de Brasília



Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, que deu saúde, paz e sabedoria para realizar esse grande sonho. Enquanto houver amor e fé nunca caminharemos sozinhos.

Aos meus pais, Vânia e Glediston, e ao meu irmão Vitor por todo apoio e confiança, por não hesitarem em me ajudar, e por serem a minha base. Sem eles definitivamente não teria chegado até aqui, eles são meus maiores exemplos.

Aos meus familiares que apoiaram essa jornada. Obrigada por vibrarem por mim em cada passo até agora e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus orientadores Dr. Octávio Luiz Franco e Dra. Angela Mehta pela confiança e pela oportunidade de fazer parte da equipe deles. Obrigada por acreditarem em mim nos momentos de surto e quando nem eu mesma acreditava, sem dúvidas cresci pessoal e profissionalmente e vocês são grandes responsáveis por isso.

Aos meus amigos, obrigada por me entenderem e apoiarem, só vocês sabem o que isso significa pra mim e o quanto o apoio de vocês foi fundamental. Obrigada por segurarem essa barra junto comigo.

Às minhas amigas Luiza, Ingrid, Maysa, Joana, Fernanda, Mariana, Caroline, Ana Laura, Beatriz, Bianca, Carolina, Carolyne, Rebeca, Vanessa, por estarem torcendo por mim, por serem meu porto seguro na hora das crises e me estimularem a prosseguir em cada passo, quando tudo que eu queria era desistir, e por me proporcionarem momentos de descontração, esses me salvaram, com certeza. Obrigada por fazerem parte disso, eu amo vocês.

Aos meus amigos de graduação, Leonardo e Lucas, por me apoiarem e estarem junto comigo, mesmo que de longe, estamos juntos nessa.

Aos colegas de laboratório, principalmente Liana, Rhayfa, Isabel, Camila, Daiane, Mylena, Luiza, Mariana, Nelson, Osmar, Stephan, William, Allan obrigada por todo apoio e por sempre estarem dispostos a ouvir meus desabafos, vocês tornaram tudo mais leve.

Agradeço ainda a todas as outras pessoas que me apoiaram ou estiveram presentes durante essa caminhada até aqui, principalmente funcionários, técnicos e outros profissionais que tiveram participação nos experimentos.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, Universidade Católica de Brasília,
Embrapa, INCT, CNPq, CAPES pelo suporte.

“Continue a nadar, continue a nadar! Continue a nadar, nadar, nadar... Pra achar a solução, nadar, nadar!” (GRAHAM WALTERS, PROCURANDO NEMO, 2003)

RESUMO

A resistência bacteriana consiste em uma das maiores ameaças à saúde no mundo, visto que reduz o tratamento efetivo de infecções e aumenta a mortalidade associada a doenças bacterianas comuns. Nesse contexto, a busca por estratégias para o controle de patógenos e da resistência antimicrobiana se faz necessária. Duas das estratégias desenvolvidas para combater esses microrganismos têm sido a terapia combinada de antimicrobianos e a prospecção de peptídeos antimicrobianos. No presente trabalho investigamos a efetividade *in vitro* de peptídeos prospectados do solo do Cerrado e a efetividade *in vitro* dos antimicrobianos aceturato de diminazeno, cloranfenicol e estreptomicina sozinhos e em combinação contra isolados clínicos de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Para bioprospecção, o material foi coletado em solo nativo do Cerrado, as proteínas totais foram extraídas e os peptídeos identificados por LC-MS / MS foram analisados pelos algoritmos *sense the moment* e CAMP, a fim de prever peptídeos antimicrobianos. De todos os peptídeos com possível atividade antimicrobiana, 7 foram selecionados, sintetizados e testados *in vitro* como agentes antimicrobianos contra os isolados. Assim como, foi avaliada a atividade *in vitro* de aceturato de diminazeno, estreptomicina e cloranfenicol contra isolados de bactérias. Os peptídeos sintetizados não demonstraram atividade antimicrobiana quando desafiados por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Sendo assim, para este trabalho, a prospecção *in silico*, metaproteômica associada aos algoritmos de predição, não se demonstrou um método eficaz para a identificação de peptídeos antimicrobianos. Além disso, para a segunda estratégia de controle, o aceturato demonstrou ser sinérgico com a estreptomicina e o cloranfenicol contra *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de humanos e animais. Contra *S. aureus*, por outro lado, o efeito sinérgico foi observado apenas na combinação de aceturato e cloranfenicol. Essas combinações de antimicrobianos apresentaram resultados importantes, demonstrando que essa estratégia pode ser utilizada como uma alternativa no controle de patógenos.

Palavra chave: Peptídeos. Prospecção. Sinergismo.

ABSTRACT

Bacterial resistance is one of the greatest world health threats, reducing the effective infections treatment and increasing mortality associated to common bacterial diseases. In this context, the strategies search for pathogens and antimicrobial resistance control is necessary. Two of the strategies developed to combat these microorganisms have been the combined antimicrobials therapy and antimicrobial peptides prospection. In the present work, we have investigated the *in vitro* peptides effectiveness prospected from the Cerrado soil and the *in vitro* effectiveness of antimicrobials diminazene acetate, chloramphenicol and streptomycin alone and in combination against clinical isolates of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *S. aureus*. For bioprospection, the material was collected from native Cerrado soil, the total proteins were extracted and the peptides were further identified by LC-MS / MS. Peptides were analyzed by sense the moment and CAMP algorithms, in order to predict antimicrobial peptides. Of all peptides with possible antimicrobial activities, 7 were selected, synthesized and *in vitro* tested against bacterial isolates. Synthesized peptides did not show antimicrobial activity when challenged by Gram-positive and Gram-negative bacteria. Thus, for this work, *in silico* prospecting, the metaproteomics associated with the prediction algorithms, has not been shown to be an effective method for the identification of antimicrobial peptides. In addition, for the second control strategy, acetate has been shown to be synergistic with streptomycin and chloramphenicol against *E. coli* and *K. pneumoniae* isolated from humans and animals. Against *S. aureus*, otherwise, a synergistic effect was observed in combination with acetate and chloramphenicol. These combinations of antimicrobials showed important results, demonstrating that this strategy can be used as an alternative at pathogens control.

Keyword: Peptides. Prospection. Synergism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Principais mecanismos de resistência bacteriana. Adaptado de Biomériux, 2019.17
- Figura 2 – Movimento de cepas/genes bacterianos resistentes a antibióticos entre diferentes ecossistemas. Adaptado de Sharma, 2018.19
- Figura 3 – Representação do método checkerboard, utilizado para avaliação do sinergismo entre os antimicrobianos.41
- Figura 4 – Espectros de massas dos peptídeos sintetizados a partir da metaproteômica do solo do Cerrado associada a algoritmos de predição gerados no equipamento MALDI-ToF obtidos no modo de ionização positiva, usando o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz.44
- Figura 5 – Cinética de crescimento em função do tempo para a combinação aceturato de diminazeno x estreptomina frente à cepa E. coli 94, onde estreptomina é representada pela letra E, aceturato de diminazeno pela letra A e a combinação pela sigla Sin. O controle foi realizado em ausência dos antimicrobianos. Os resultados são expressos como a média dos valores representativos de um experimento realizado em triplicata.52
- Figura 6 – Cinética de crescimento em função do tempo para a combinação aceturato de diminazeno x cloranfenicol frente à cepa E. coli 94, onde cloranfenicol é representado pela letra C, aceturato de diminazeno pela letra A e a combinação pela sigla Sin. O controle foi realizado em ausência dos antimicrobianos e estreptomina 1 x CIM foi utilizada como controle positivo. Os resultados são expressos como a média dos valores representativos de um experimento realizado em triplicata.53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Antimicrobianos utilizados nos ensaios in vitro.	27
Tabela 2 – Relação dos isolados utilizados nos experimentos in vitro.	39
Tabela 3 – Valores do ICIF correspondentes as diferentes interações segundo Bonapace, 2002. ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada; CIF: Concentração Inibitória Fracionada	42
Tabela 4 – Peptídeos selecionados a partir da prospecção do solo do Cerrado por metaproteômica associada a algoritmos de predição para síntese e avaliação da atividade antimicrobiana in vitro.	43
Tabela 5 – Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro dos peptídeos 1 a 7, sintetizados a partir da bioprospecção do solo do Cerrado por metaproteômica, contra E. coli e S. aureus pelo método de microdiluição. Os experimentos foram realizados em triplicata.	45
Tabela 6 – Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro dos antimicrobianos aceturato de diminazeno, estreptomicina e cloranfenicol contra isolados de E. coli, K. pneumoniae e S. aureus pelo método de microdiluição. Os experimentos foram realizados em triplicata.	47
Tabela 7 – Efeito sinérgico in vitro da combinação de aceturato de diminazeno e estreptomicina pelo método checkerboard contra isolados de E. coli, K. pneumoniae e S. aureus. Os experimentos foram realizados em triplicata. CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; A: aceturato de diminazeno; E: estreptomicina; S: sinérgico; I: indiferente.	49
Tabela 8 – Efeito sinérgico da combinação de aceturato de diminazeno e cloranfenicol pelo método checkerboard contra isolados de E. coli, K. pneumoniae e S. aureus. Os experimentos foram realizados em triplicata. CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; A: aceturato de diminazeno; C: cloranfenicol; S: sinérgico; I: indiferente..	51

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	“ <i>American type culture collection</i> ”, coleção de cultura do tipo americano
CAMP	“ <i>Collection of Antimicrobial Peptides</i> ”, coleção de peptídeos antimicrobianos
CID	Colisão induzida por dissociação
CIF	Concentração inibitória fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima
DDA	“ <i>Data-dependent acquisition</i> ”, aquisição dependente de dados
DNA	“ <i>Deoxyribonucleic acid</i> ”, ácido desoxirribonucléico
ESI	“ <i>Electrospray ionization</i> ”, ionização por eletrospray
FDA	“ <i>Food and drug administration</i> ”
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
LC-MS/MS	“ <i>Liquid chromatography associated with mass spectrometry</i> ”, cromatografia líquida associada a espectrometria de massa
MALDI	“ <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> ”, ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MALDI-ToF	“ <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of flight</i> ”, ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo
MS	“ <i>Mass spectrometry</i> ”, espectrometria de massa
OMS	Organização mundial da saúde
PAM	Peptídeo antimicrobiano
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RNA	“ <i>Ribonucleic acid</i> ”, ácido ribonucléico
RF	“ <i>Random forest</i> ”, floresta aleatória
SVM	“ <i>Support vector machine</i> ”, máquina de vetor de suporte
UFC	Unidades formadoras de colônia
UTI	Unidade de terapia intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	INFECÇÕES BACTERIANAS.....	13
1.2	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	15
1.3	INTERFACE HUMANO-ANIMAL NA RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	15
1.4	ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DE INFECÇÕES BACTERIANAS.....	20
1.4.1	Peptídeos antimicrobianos	21
1.4.2	Antimicrobianos	25
1.4.2.1	Estreptomicina.....	27
1.4.2.2	Cloranfenicol.....	28
1.4.2.3	Aceturato de diminazeno.....	29
1.4.3	Combinação de compostos	30
2	OBJETIVO	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3	METODOLOGIA	34
3.1	BIOPROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS A PARTIR DO SOLO.....	34
3.1.1	Coleta e extração de proteínas	34
3.1.2	Solubilização e digestão de proteínas	34
3.1.3	Dessalinização das amostras	35
3.1.4	Análise dos peptídeos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS)	35
3.1.5	Seleção de peptídeos	36
3.1.6	Síntese dos peptídeos e confirmação da identidade por espectrometria de massa	36
3.1.7	Avaliação da atividade antimicrobiana	37
3.1.7.1	Microrganismos.....	37
3.1.7.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	37
3.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA COMBINAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS.....	37
3.2.1	Microrganismos	38

3.2.2	Agentes antimicrobianos.....	40
3.2.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	40
3.2.4	Ensaio <i>checkerboard</i>	40
3.2.5	Avaliação da cinética de ação bactericida (<i>time-kill</i>).....	42
4	RESULTADOS.....	43
4.1	BIOPROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS A PARTIR DO SOLO.....	43
4.1.1	Seleção de peptídeos.....	43
4.1.2	Confirmação da pureza dos peptídeos.....	44
4.1.3	Atividade antimicrobiana dos peptídeos determinada pelo método de microdiluição.....	45
4.2	COMBINAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS.....	45
4.2.1	Atividade antimicrobiana determinada pelo método de microdiluição.....	45
4.2.2	Atividade sinérgica determinada pelo método <i>checkerboard</i>	47
4.2.3	Ensaio <i>time-kill</i>	52
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÕES.....	59
	PERSPECTIVAS.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFECÇÕES BACTERIANAS

O conhecimento sobre os microrganismos cresceu em ritmo acelerado desde sua descoberta, quando foram reconhecidos como agentes de infecção. Seu impacto positivo sobre a saúde humana e sua importância na alimentação e fermentação levou um tempo para se estabelecer (THAKUR; ROKANA; PANWAR, 2016). Entretanto há séculos, a exploração de microrganismos e seus metabólitos para aplicações úteis em alimentos, rações, laticínios, fermentação, farmacêuticas e outras áreas, tem sido praticada (KUMAR, 2016; TAMANG *et al.*, 2016).

Os microrganismos podem ser benéficos ou patogênicos, constituindo-se numa ameaça a humanos, animais e plantas através de infecções. Para combater esses agentes, várias medidas podem ser empregadas, sendo uma das principais a administração de antimicrobianos. A descoberta da penicilina retardou a prevalência de infecções e salvou milhões de vidas. A implantação da antibioticoterapia parecia ditar o fim das doenças infecciosas no mundo, visto que novos antibióticos foram desenvolvidos e a incidência de infecções reduziu consideravelmente (FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008). No entanto, durante seu discurso ao receber o Prêmio Nobel, Alexander Fleming afirmou que as bactérias poderiam desenvolver resistência contra as terapias antibacterianas, e não muito tempo depois foram relatados casos em que a droga não foi eficaz (ABRAHAM; CHAIN, 1940; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Infecções bacterianas constituem uma ameaça à saúde humana e um grande problema para os sistemas de saúde, devido a uma crescente incidência e a disseminação (WATER *et al.*, 2015). Nas últimas três décadas, doenças infecciosas emergentes e reincidentes foram reconhecidas como um dos mais importantes problemas de saúde pública e apesar dos cuidados de saúde modernos, as doenças infecciosas continuam a ser uma das principais causas de mortalidade global, sendo os patógenos bacterianos os que mais preocupam (WANG *et al.*, 2016).

Grande parte das bactérias que colaboram para a alta mortalidade são frequentemente encontradas como componentes comensais da microbiota de humanos e animais (TURNBAUGH *et al.*, 2007). Essas bactérias comensais possuem

baixa virulência e um papel de proteção, impedindo a colonização de agentes patogênicos. Entretanto, elas podem atuar como bactérias oportunistas e causar infecções (ANVISA, 2004).

As bactérias Gram-negativas ganham uma maior atenção devido à natureza de sua membrana externa (FAIR; TOR, 2014). Devido a surtos registrados em diversos países, a *Klebsiella pneumoniae* se destaca como uma ameaça urgente à saúde (HOLT *et al.*, 2015). *K. pneumoniae* é conhecida por ser um patógeno oportunista que possui forma de bacilo não móvel, sendo anaeróbio facultativo (SIKARWAR; BATRA, 2011). São bacilos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e constituem a microbiota intestinal da maioria dos animais, incluindo os seres humanos.

K. pneumoniae pode colonizar a pele, faringe, bexiga e trato gastrointestinal, podendo causar pneumonia, bacteriemia, septicemia, tromboflebite e infecções do trato urinário (ZHAO *et al.*, 2010). Dados da Anvisa (2018), apontam que *K. pneumoniae* foi o microrganismo Gram-negativo mais isolado e notificado nas UTIs brasileiras, sendo assim, as infecções causadas por *K. pneumoniae* resistentes representam um grande desafio terapêutico, e a fim limitar sua disseminação e auxiliar na redução dos índices de morbidade e mortalidade ligados a doenças infecciosas (DIENSTMANN *et al.*, 2010), pesquisas sobre expressão e tratamento de infecções por *Klebsiella* spp. são relevantes e se fazem necessárias.

Escherichia coli, outra cepa Gram-negativa, também pode ser considerada de grande importância quando se referem a infecções e patologias em humanos. Apesar de pertencer a microbiota, também é apontada como um dos microrganismos mais isolados nas UTIs brasileiras (ANVISA, 2018). A *E. coli* coloniza o sistema gastrointestinal de humanos de forma comensal, porém existem cepas que adquirem fatores de virulência específicos, se adaptam a outros nichos e causam diversos tipos de infecções (RODRIGUEZ-SIEK *et al.*, 2005). Além de causar diversos tipos de infecções em humanos, a *E. coli* também é um patógeno frequentemente associado com infecções em animais de produção.

Apesar das bactérias Gram-negativas ganharem uma maior atenção, as Gram-positivas também representam uma parcela das infecções. *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva, foi um dos primeiros microrganismos bacterianos a serem controlados por meio da descoberta e uso dos antibióticos. O *S. aureus* é um patógeno extracelular, coagulase positivo e se apresenta na forma de cocus

(FOSTER, 1996). Pertence a microbiota animais, incluindo humanos, e está presente em cerca de 50% de indivíduos saudáveis (BALABAN; RASOOLY, 2000; WENDLANDT; SCHWARZ; SILLEY, 2013).

O *S. aureus* consiste em um importante patógeno humano, e uma das mais importantes espécies patogênicas na medicina veterinária. Em humanos, é responsável por uma variedade de doenças, que se manifestam muitas vezes de forma assintomática. Este patógeno invade o hospedeiro quando a pele ou mucosas estão comprometidas, sendo um importante causador de furúnculos, impetigo e outras infecções superficiais da pele (FOSTER, 1996). Além disso, pode causar infecções mais graves, principalmente em pessoas debilitadas por doenças crônicas, lesões traumáticas, queimaduras ou imunossupressão. Embora seja mais comum as infecções na pele, o *S. aureus* é capaz de infectar qualquer tecido e progredir para infecções sistêmicas, podendo levar até a morte (TODD, 2005).

Devido a pressão seletiva exercida pelo uso frequente de antimicrobianos, o *S. aureus* foi uma das primeiras cepas a apresentar resistência aos antimicrobianos, ganhando assim uma maior importância e frequência em infecções. Entre as cepas bacterianas Gram-positivas resistentes, o *S. aureus*, no ano de 2018 foi o microrganismo mais isolado e notificado nas UTIs brasileiras (ANVISA, 2018).

1.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência antimicrobiana ou resistência a antibióticos, melhor definida como a falta de resposta a doses padrão de antimicrobianos clinicamente relevantes (GANGULY *et al.*, 2011), é uma propriedade adquirida pelos patógenos de contornar os efeitos dos antibióticos aos quais já foram sensíveis. Essa redução na eficácia dos antibióticos torna os tratamentos mais complexos, dispendiosos, extensos e algumas vezes impraticáveis.

A resistência bacteriana constitui um problema de saúde pública mundial que desperta a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como a Anvisa e a Organização Mundial de Saúde (OMS). São considerados microrganismos resistentes os que apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano em três ou mais classes de antibióticos (MAGIORAKOS *et al.*, 2011).

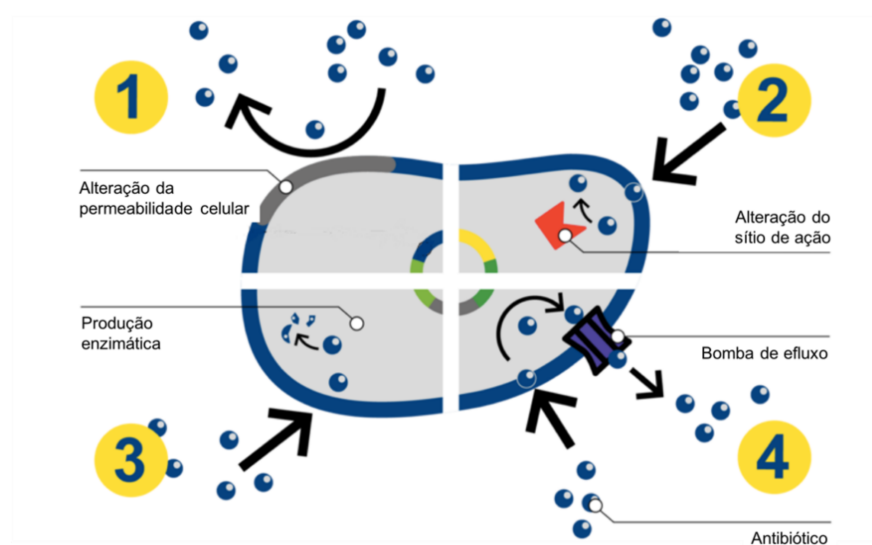
Após a descoberta da penicilina e a introdução da mesma no mercado, foram relatados casos de *S. aureus* resistentes, em que a droga não foi eficaz (ABRAHAM; CHAIN, 1940; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Atualmente, existem várias espécies de bactérias resistentes aos antimicrobianos disponíveis (BREIDENSTEIN *et al.*, 2012). No Brasil, o uso controlado de antibióticos só passou a ser válido em 2010, após a publicação da RDC 44/2010, que preconiza que todos os medicamentos contendo princípio ativo de antimicrobianos sejam distribuídos apenas mediante a receita de controle especial (ANVISA, 2010). Em 2009, previamente à publicação da RDC, dados da OMS apontavam que mais de 50% das prescrições de antibióticos no mundo eram inadequadas (OPAS; OMS, 2009).

Além dos antibióticos presentes na natureza, a ampla utilização indevida de antibióticos pela população e na agropecuária, constitui uns dos fatores que leva ao aumento da resistência bacteriana e exige medidas urgentes para combater o surgimento de novas cepas resistentes. A utilização indiscriminada de antibióticos para terapia, ou até mesmo profilaxia, pode aumentar a pressão de seleção que favorece o surgimento, multiplicação e disseminação de cepas resistentes.

As bactérias podem ser naturalmente resistentes a uma classe de antimicrobianos ou podem adquirir genes de resistência de outros microrganismos e manifestarem a resistência. Genes de resistência a antibióticos já existiam antes mesmo do uso difundido dos antibióticos, uma vez que os organismos estão competindo por recursos no ambiente, e assim permitindo o aparecimento de características que melhoram suas chances de sobrevivência (ANDERSSON; HUGHES, 2010).

A maioria dos antibióticos naturais foram isolados de fungos e bactérias que ocorrem naturalmente no ambiente. As cepas, produtoras de antibióticos, podem ter genes que codifiquem a resistência ao antibiótico. Esses genes provavelmente foram submetidos a transferência horizontal, disseminando a resistência antes mesmo da seleção externa causada pelo uso dos antibióticos (ALLEN *et al.*, 2010; WRIGHT, 2007). Esses genes de resistência adquiridos podem possibilitar o bloqueio da entrada do antimicrobiano na célula, a produção de enzimas capazes de degradar o agente antibacteriano, a expressão de sistemas de efluxo eficientes que impedem a entrada de medicamentos ou mesmo a capacidade de atingir o alvo intracelular, a alteração dos sítios alvo do antimicrobiano, ou a produção de vias metabólicas alternativas, que impedem a ação da droga (Figura 1) (ALLEN *et al.*, 2010; TENOVER, 2006).

Figura 1 – Principais mecanismos de resistência bacteriana. Adaptado de Biomériux, 2019.



Fonte: Biomériux (2019).

Dentre os mecanismos de resistência mencionados, o mais frequente e importante compreende a produção de enzimas que degradam os antimicrobianos tornando-os inativos. Um exemplo de resistência, voltado para a atividade enzimática, inclui a inativação do cloranfenicol e dos aminoglicosídeos. A resistência bacteriana ao cloranfenicol baseia-se na inativação por acetilação (RØNNING; EINARSEN; ASP, 2006). As enzimas acetiltransferases são responsáveis por promover a acetilação do cloranfenicol através de ligações covalentes entre um ou dois grupos de acetil, derivados da acetil-CoA sintetase, e um grupo de hidroxila do fármaco, impedindo que assim o cloranfenicol interaja com os ribossomos bacterianos (KEHRENBERG *et al.*, 2005).

Semelhante ao cloranfenicol, as enzimas acetiltransferases catalisam uma acetilação específica no grupo amino dos aminoglicosídeos e adicionam um grupo acetil (LEVINGS *et al.*, 2005; PINSETTA, 2010). Contudo, a resistência ao aminoglicosídeo também pode ocorrer por uma mutação no gene *rpsL*, que codifica a proteína ribossomal S12 no ribossomo 30S (CARTER *et al.*, 2000). Além de adquirirem genes de resistência a partir das mutações, que ocorrem comumente durante a replicação, os mecanismos pelos quais as bactérias transferem seus genes para outras também podem ser um problema na expansão da resistência bacteriana. A transferência de genes normalmente se dá entre membros da mesma espécie,

podendo ocasionalmente ocorrer entre membros de espécies diferentes (KAYSER, 2005).

A transferência de material genético entre cepas bacterianas resistentes e cepas suscetíveis aos antimicrobianos pode ocorrer por meio de mecanismos como a transformação, a conjugação ou a transdução. Na transformação, a cepa doadora libera o material genético no meio e este pode ser absorvido pela cepa receptora, já na conjugação, é necessário um contato físico, por meio do pili, para que haja a transferência unidirecional do material. A transdução, por sua vez, necessita de um vetor (um bacteriófago) para que o material genético seja transferido (ALEKSHUN; LEVY, 2007).

1.3 INTERFACE HUMANO-ANIMAL NA RESISTÊNCIA BACTERIANA

A epidemiologia dos microrganismos resistentes a antimicrobianos na interface humano-animal envolve uma infinidade de rotas de transmissão, pressão antimicrobiana seletiva, além de outros fatores ecológicos, bem como a transferência horizontal de genes de resistência entre espécies e gêneros bacterianos. Sendo assim, quando se trata de lidar com a transmissão zoonótica de patógenos resistentes, precisamos envolver uma ampla gama de partes interessadas, incluindo agricultores, veterinários, profissionais de segurança alimentar, médicos e especialistas em monitoramento e controle do meio ambiente e da vida selvagem (WEGENER, 2012).

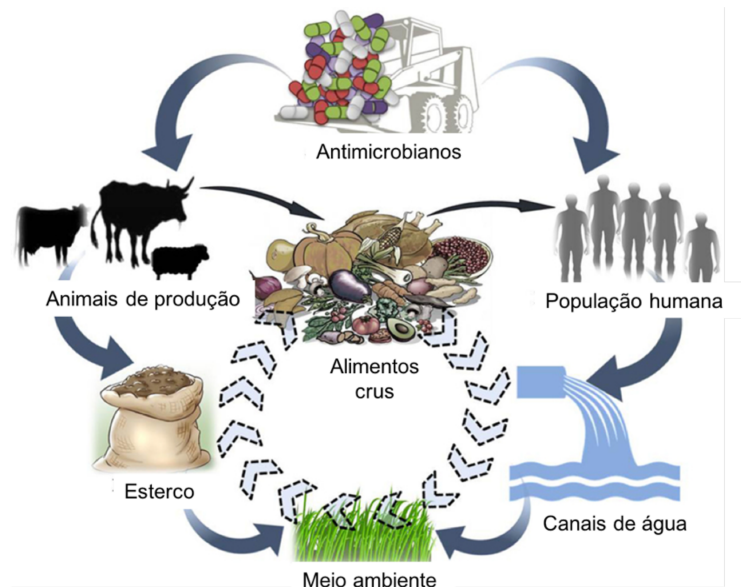
Os antimicrobianos têm sido utilizados de maneira terapêutica, metafilática, profilática e até como promotores de crescimento, sendo a maior parte do uso para prevenção de doenças. O uso de antimicrobianos tornou-se importante na produção industrial, visto que em quase todos os alimentos para animais em crescimento são usados como suplemento em várias doses, variando entre as concentrações subterapêuticas e doses terapêuticas completas. Estima-se que os volumes de antimicrobianos usados em animais produtores de alimentos excedam o uso em seres humanos em todo o mundo (AARESTRUP; JENSER, 2008).

O uso de antimicrobianos na prática veterinária, tanto para animais domésticos quanto para animais produtores de alimentos, pode selecionar os genes que codificam a resistência. Esses genes, quando selecionados e expressos em determinadas cepas, codificando características de resistência, podem ser

transferidos para humanos, resultando em um perigo para a saúde pública. Cepas de origem animal resistentes aos antimicrobianos podem disseminar-se para os humanos através da cadeia de fornecimento alimentar (carne e laticínios), do contato direto com animais ou através de rotas ambientais (LHERMIE; GRÖHN; RABOISSON, 2017).

A relação entre o uso de antimicrobianos e a ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos não ocorre apenas em animais, mas também em humanos com contato próximo. Interações diretas ou indiretas entre seres humanos e animais podem levar à transmissão de cepas e genes de resistência aos antibióticos de animais para humanos (Figura 2). Agricultores, manipuladores de alimentos e veterinários estão mais propensos a serem infectados por cepas resistentes (CHANG *et al.*, 2014; MARSHALL; LEVY, 2011), enquanto que os consumidores podem ficar expostos através do consumo de produtos contaminados, como carne, leite e seus derivados.

Figura 2 – Movimento de cepas/genes bacterianos resistentes a antibióticos entre diferentes ecossistemas. Adaptado de Sharma, 2018.



Fonte: Sharma (2018).

Recentemente, alguns relatos retrataram a presença de um grande número de bactérias resistentes e genes de resistência em uma variedade de produtos de origem animal (COETZEE *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016). O sequenciamento do genoma completo e estudos filogenéticos propuseram que cepas de *Staphylococcus*

aureus resistentes à metilina (MRSA) presentes no gado, evoluíram de cepas de *S. aureus* suscetíveis à metilina de origem humana. Além disso, outros estudos identificaram cepas bacterianas de origem animal em populações humanas sem qualquer exposição direta a animais, ligando-os ao consumo ou manuseio de alimentos (FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2016). Casos subsequentes de infecções, em que animais de criação frequentemente transmitem MRSA associada ao gado para humanos expostos (KOCK *et al.*, 2017), são de primordial preocupação. Este problema de transmissão de cepas resistentes é mais relevante em países em desenvolvimento, onde não existem diretrizes ou diretrizes estabelecidas não são seguidas, e também têm alta carga de doenças infecciosas, juntamente com poucos recursos médicos (CHANTZIARAS *et al.*, 2014; JAMALI *et al.*, 2015).

1.4 ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE DE INFECÇÕES BACTERIANAS

A resistência antimicrobiana consiste em uma das maiores ameaças à saúde no mundo, visto que reduz o tratamento efetivo de infecções e aumenta a mortalidade associada a doenças bacterianas comuns (KLEVENS *et al.*, 2007). A prevalência da resistência antimicrobiana pode ser diminuída através da diminuição do consumo de antibióticos. Além disso, o constante surgimento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos (LONG; VESTER, 2012) torna a resistência um desafio que requer uma abordagem multifacetada, incluindo inovação biomédica, melhor controle do consumo de antibióticos e das taxas de resistência antimicrobiana, diagnóstico microbiológico rápido e uso clínico e veterinário reduzido (CASSIR; ROLAIN; BROUQUI, 2014).

Embora a resistência bacteriana continue a emergir, a taxa de desenvolvimento de antibióticos está diminuindo, o que gera um déficit de terapias eficazes contra infecções bacterianas. Portanto, encontrar e introduzir novos antibióticos tornou-se mais desafiador e a pesquisa antimicrobiana não é uma opção atraente para investidores que buscam retornos rápidos e substanciais (SHARMA *et al.*, 2018). Soluções mais inovadoras e ousadas para reduzir a resistência aos antibióticos e acelerar a descoberta e introdução de novas alternativas seguras, livres de resistência e econômicas (FOUNOU; FOUNOU; ESSACK, 2016).

Nesse contexto, a busca por estratégias para o controle de patógenos e da resistência antimicrobiana se faz necessária. As alternativas ideais aos antibióticos

devem ser não-tóxicas, serem eliminadas facilmente pelo organismo, estáveis durante o trânsito gastrointestinal, facilmente decompostas e favoráveis ao meio ambiente, seletivas contra patógenos, com mínimo ou nenhum efeito sobre a microbiota intestinal, e acima de tudo serem livres de resistência (CHENG *et al.*, 2014).

Algumas estratégias alternativas para combater a resistência antimicrobiana e seus mecanismos de ação diretos e indiretos incluem (1) a vacinação, que ajuda a prevenir o curso de infecções através do desenvolvimento de células imunes e da produção de anticorpos específicos; (2) fago terapia, que utiliza o bacteriófago lítico ou seus produtos genéticos purificados para tratar infecções bacterianas; (3) peptídeos antimicrobianos, bacteriocinas e fitocompostos que inibem diretamente o crescimento bacteriano agindo na membrana celular; (4) CRISPR-Cas, que tem como alvo a modificação de genes de resistência em patógenos; (5) nanopartículas baseadas em metal que ajudam no bloqueio de vias enzimáticas, alteração da parede celular e vias de material nucleico; (6) antibioticoterapia; (7) combinação de compostos, que visa o sinergismo entre 2 antimicrobianos (SHARMA *et al.*, 2018).

1.4.1 Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (PAMs), reconhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro, são uma das principais alternativas à antibioticoterapia e estão abundantemente distribuídos na natureza (NARAYANA; CHEN, 2015). Eles estão presentes em todos os organismos, e além de possuírem uma variada diversidade estrutural e funcional, exibem notáveis propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras, o que os torna candidatos ideais para o desenvolvimento de novas terapias (SHARMA *et al.*, 2018). Os PAMs são alvo de pesquisas em todo o mundo, devido à sua habilidade em inibir o crescimento ou matar uma variedade de microrganismos responsáveis por patologias em animais, plantas e no homem. Essas moléculas proteicas têm sido isoladas de uma ampla variedade de organismos, como bactérias, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados e são tipicamente conhecidas por seu pequeno tamanho (YEAMAN; YOUNT, 2003).

Esses pequenos polipeptídeos são de natureza anfipática e exibem propriedades hidrofóbicas e catiônicas que promovem interação com as mais diversas membranas lipídicas, que se tornam alvos no mecanismo de ação destes peptídeos

(CHEEMA *et al.*, 2011). Dessa forma, essas moléculas apresentam um amplo espectro de atividade contra diversos alvos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, parasitas, vírus, entre outros (KAZEMZADEH-NARBAT *et al.*, 2010).

Além de possuírem atividades antimicrobianas, os PAMs geram efeitos positivos sobre o desempenho do crescimento dos animais, e em contraste com os antibióticos, os PAMs geralmente atacam as células do hospedeiro e previnem a infecção de maneira indireta, conferindo proteção por mecanismos alternativos, como a manutenção da homeostase e a modulação das respostas inflamatórias, gerando uma vantagem adicional sobre os antibióticos (WANG *et al.*, 2016).

Embora os PAMs possuam efeitos bactericidas potentes e sejam facilmente metabolizados sem afetar adversamente a qualidade da alimentação, existem algumas poucas restrições que limitam sua aplicação como terapia antimicrobiana, como o alto custo de produção, preocupações de segurança relativas a toxicidade, chances de desenvolvimento de resistência, baixa estabilidade durante o transporte e fácil hidrólise por proteases (CHENG *et al.*, 2014). Portanto, para serem caracterizados como substitutos eficazes para os antibióticos, muitos esforços e enfoque ainda são necessários.

A prospecção de ecossistemas inexplorados representa uma importante estratégia para encontrar linhagens microbianas e bioprodutos com relevância biotecnológica (BACH *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2014). Essa busca pela biodiversidade e bioprospecção de novos microrganismos tornou-se um dos principais focos da era biotecnológica, onde a utilização destes organismos na busca de soluções vem crescendo, principalmente pela sua extraordinária capacidade em produzir uma grande variedade de metabólitos, como peptídeos antimicrobianos.

Dentre todos os nichos ambientais naturais, os solos contêm a maior biomassa e diversidade microbiana, sendo classificados como um dos habitats mais desafiadores para os microbiologistas (MOCALI; BENEDETTI, 2010). A microbiota do solo é conhecida por desempenhar papéis essenciais em vários processos relacionados ao funcionamento e à capacidade produtiva do ecossistemas, como a decomposição da matéria orgânica (ALTIERI, 1999; BURNS *et al.*, 2013).

Microrganismos também são considerados como valiosos recursos para obter bioprodutos úteis. A indústria farmacêutica, por exemplo, tem explorado produtos naturais e entre eles estão os antibióticos, os quais são produzidos por

diversos gêneros de microrganismos (HARVEY, 2008). Apesar do pouco conhecimento existente sobre a biodiversidade do solo, a produção industrial de importantes antibióticos como as tetraciclinas, eritromicinas, vancomicinas, cefalosporinas, rifamicinas e diferentes β -lactâmicos a partir de microrganismos do solo é bem desenvolvida (OSBURNE *et al.*, 2002). Motivo pelo qual, faz com que o solo seja apontado ainda como o mais promissor ambiente para estudos de bioprospecção (LORENZ *et al.*, 2002).

A metaproteômica consiste em uma técnica que pode ser utilizada para avaliar a atividade microbiana, vias metabólicas, transdução de sinais presentes na comunidade do solo, além de identificar microrganismos presentes através da análise de proteínas expressas pelos organismos dentro do ecossistema (KEIBLINGER *et al.*, 2012; ZAMPIERI *et al.*, 2016). Devido à importância dos peptídeos, existe um ramo da proteômica que tem sido aplicado principalmente a estudos de peptídeos. O termo peptidômica foi descrito pela primeira vez por Schoofs (BAGGERMAN *et al.*, 2004; CLYNEN *et al.*, 2001) e refere-se ao conjunto de peptídeos presentes em uma amostra biológica. A peptidômica consiste em uma metodologia relativamente rápida, eficiente e passível de detectar mudanças transitórias além de identificar modificações pós-traducionais (CRAMERI; SCHULZ-KNAPPE; ZUCHT, 2005; FARROKHI; WHITELEGGE; BRUSLAN, 2008; IVANOV; YATSKIN, 2005).

Em estudos de bioprospecção, os PAMs podem ser identificados e sequenciados por espectrometria de massa. A técnica de espectrometria de massa (MS) tornou-se indispensável na pesquisa, mostrando-se uma importante ferramenta que consiste em uma técnica analítica para determinação da relação massa/carga com base no movimento de partículas carregadas em um campo elétrico e/ou magnético. As moléculas da amostra são convertidas em íons na fase gasosa e separadas de acordo com as suas relações de massa/carga (m/z) (WESTEMEIER; NAVEN, 2002). A ionização das proteínas na espectrometria ocorre por dois métodos distintos, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) e *electrospray ionization* (ESI). A identificação das proteínas pode ser realizada pelo uso da Espectrometria de Massa Sequencial, ou *in tandem* (MS/MS), onde um peptídeo do espectro é selecionado, fragmentado e o espectro gerado é então analisado pela diferença de massa molecular entre os picos e essa diferença é associada à massa molecular dos 20 aminoácidos que compõem as proteínas, fornecendo assim informações de identificação da sequência (WESTEMEIER; NAVEN, 2002).

Os testes de atividade antimicrobiana têm sido a metodologia mais adequada para a seleção de moléculas bioativas. Apesar disso, o grande número de sequências coletadas em bancos de dados torna essa metodologia inviável (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), sendo necessária uma seleção prévia dessas sequências *in silico*. O número de possíveis combinações de sequências de aminoácidos torna difícil a descoberta de novos PAMs exclusivamente através de testes experimentais em laboratórios. Portanto, muitos grupos de pesquisa estão buscando ferramentas que realizem a predição *in vitro* da atividade antimicrobiana, para fornecer conjuntos específicos de candidatos mais prováveis para a avaliação *in vitro* e/ou *in vivo*.

Nesse contexto, algoritmos de predição de atividade antimicrobiana têm sido utilizados nessa pré-seleção de sequências possivelmente antimicrobianas e podem ser determinantes na seleção de peptídeos para testes *in vitro* e *in vivo*. Existem duas estratégias distintas de predição, que levam em consideração a ordem da sequência ou a variação do tamanho da sequência. Se a predição for baseada na ordem da sequência, o tamanho não poderá variar, pois a predição é feita com base na frequência de aminoácidos em cada posição; por outro lado, se a predição for baseada na variação do tamanho da sequência, são consideradas as propriedades físico-químicas, não levando em conta a ordem das sequências, uma vez que as sequências embaralhadas podem ter os mesmos valores das propriedades que a sequência ordenada (LOOSE *et al.*, 2006; PORTO; PIRES; FRANCO, 2017).

Atualmente, existem três sistemas de predição disponíveis como programas independentes ou servidores online, incluindo AntiBP (LATA; MISHRA, 2010), CAMP (WAGHU *et al.*, 2014) e CS-AMPPred (PORTO; PIRES; FRANCO, 2012). O AntiBP consiste em um modelo de máquina de vetor de suporte (SVM, *Support Vector Machine*) que utiliza os dados do N- e C-terminal para a predição de atividade antimicrobiana. O CAMP é um preditor capaz de analisar sequências de tamanhos variáveis que utiliza *random forest* (RF), análise discriminante (*Discriminant Analysis*; DA) e SVM. O CS-AMPPred utiliza um modelo de SVM desenvolvido utilizando características físico-químicas para predição de atividade antimicrobiana de peptídeos exclusivamente estabilizados por cisteína (PORTO; PIRES; FRANCO, 2017).

O surgimento dos bancos de dados de peptídeos antimicrobianos tornou mais fácil o entendimento e projeto racional de PAMs por ser uma fonte de

informações disponível para comparações, análises e testes com PAMs através dos mais diversos métodos e algoritmos. A identificação de PAMs de bancos de dados ganhou atenção como um ramo da genômica estrutural e da bioinformática, tendo contribuído de forma decisiva no que se refere à identificação, concepção e estudos de mecanismos de ação de PAMs. Várias abordagens têm sido aplicadas para a identificação de PAMs de bancos de dados, incluindo alinhamentos locais, algoritmos de predição e também previsões tridimensionais de estrutura (PORTO; PIRES; FRANCO, 2017).

Os sistemas de predição são construídos levando em consideração apenas o peptídeo maduro, mas em bancos de dados os peptídeos são encontrados como suas sequências precursoras, o que acrescenta uma complexidade à predição (ZHU, 2008). Apesar disso, esses métodos de predição foram aplicados como um complemento à busca por sequências antimicrobianas (PORTO; FENSTERSEIFER; FRANCO, 2014; PORTO; PIRES; FRANCO, 2012). Além disso, também são utilizados para a otimização de moléculas já existentes. Desde a década de 1990, diversos métodos têm sido aplicados no desenvolvimento racional de PAMs, objetivando gerar análogos de tamanho reduzido, com atividade antimicrobiana superior e baixa toxicidade. Isto permite explorar grandes quantidades de sequências, facilitando a identificação e seleção de moléculas (FJELL *et al.*, 2012). Contudo, os modelos *in silico* devem ser associados aos ensaios *in vitro* e/ou *in vivo* a fim de diminuir a quantidade de moléculas a serem avaliadas e maximizar as chances de sucesso na identificação de novos PAMs com potencial antimicrobiano.

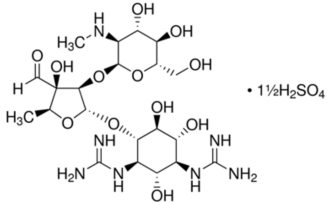
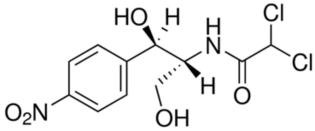
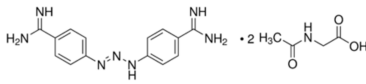
1.4.2 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são utilizados em medicina humana e veterinária há mais de 60 anos. Além disso, o uso de antimicrobianos tem sido aplicado na para prevenir, controlar e tratar infecções e para melhorar o crescimento e a eficiência alimentar, quando se fala em agricultura (ANGULO *et al.*, 2004; SILBERGELD; GRAHAM; PRICE, 2008). Os antimicrobianos também se mostraram importantes para a produção animal sustentável e para o controle de infecções em animais que poderiam ser transmitidas aos seres humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

A escolha de um agente antimicrobiano é crucial em qualquer regime terapêutico, levando em consideração a capacidade de ação, absorção e penetração do antimicrobiano no local da infecção. Os agentes antimicrobianos podem ser divididos em substâncias de amplo espectro, capazes de inibir o crescimento e até mesmo matar uma ampla gama de bactérias, e substâncias de estreito espectro, utilizados para o tratamento de patógenos específicos (SCHWARZ; KEHRENBURG; WALSH, 2001).

A maioria dos antibióticos utilizados na clínica são classificados segundo seu mecanismo de ação. Existem quatro principais modos de ação: interferência na síntese da parede celular bacteriana, como os β – lactâmicos; inibição da síntese proteica, como a estreptomicina e o cloranfenicol; interferência na síntese dos ácidos nucleicos, como as fluoroquinolonas; e inibição vias metabólicas importantes para a bactéria, como as sulfonamidas (TENOVER, 2006). A tabela a seguir (Tabela 1) resume os antimicrobianos utilizados no presente estudo, assim como sua estrutura e mecanismos de ação e resistência.

Tabela 1 – Antimicrobianos utilizados nos ensaios *in vitro*.

Antimicrobianos	Estrutura da molécula	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência
Estreptomicina		Inibidor da síntese proteica	Inativação por acetilação e mutação no gene rpsL
Cloranfenicol		Inibidor da síntese proteica	Inativação por acetilação
Aceturato de diminazeno		Mecanismo de ação não definido	Mecanismo de resistência não definido

Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

1.4.2.1 Estreptomicina

A descoberta da penicilina estimulou a pesquisa e o desenvolvimento de outros antimicrobianos. Em 1943, o fungo *Streptomyces griseus*, que produzia a estreptomicina, um potente agente antimicrobiano ativo contra vários microrganismos aeróbicos Gram-positivos, foi descoberto e isolado (SILVA, 1994).

Os aminoglicosídeos são importantes antibióticos utilizados no tratamento de infecções bacterianas que podem ser produzidos por microrganismos, além de sinteticamente. Dentre os produzidos por microrganismo, a estreptomicina apresenta um bom espectro de atividade antibacteriana, mas é tóxica e apresenta uma alta incidência de resistência (SILVA, 1994). Os aminoglicosídeos podem ser utilizados no tratamento de doenças causadas por bactérias aeróbicas Gram-positivas e Gram-negativas, não sendo ativos contra bactérias anaeróbicas, pois sobre essas condições sua ação é bloqueada (GETEK; VESTAL; ALEXANDER, 1991).

A descoberta da estreptomicina, o primeiro aminoglicosídeo isolado, possibilitou o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (ISOHERRANEM; SOBACK, 1999). O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos é baseado na habilidade de inibir a síntese de proteína dos microrganismos, resultando em uma rápida concentração dependente da ação bactericida (MARZO; BO, 1998).

Na medicina veterinária, os aminoglicosídeos são amplamente utilizados no tratamento de infecções por bactérias, como por exemplo, enterites e mastites (MARZO; BO, 1998). Os mais comumente utilizados são a gentamicina, neomicina, dihidroestreptomicina e estreptomicina. Apesar disso, existe uma grande preocupação relacionada a presença de resíduos desses antibióticos em alimentos devido a sua toxicidade, visto que os aminoglicosídeos são em sua maioria nefro e ototóxicos (ISOHERRANEM; SOBACK, 1999; STEAD, 2000).

Os aminoglicosídeos são antibióticos caracterizados pela presença de um anel aminociclitol ligado a dois ou mais açúcares por ligações glicosídicas (MARZO; BO, 1998). A resistência a esses antibióticos pode ocorrer por três mecanismos, sendo o principal a produção de enzimas que causam a inativação do antibiótico através da fosforilação, adenilação ou acetilação de grupos hidroxila ou amino. Por isso, a estreptomicina é importante, principalmente quando utilizada em associação à outros antimicrobianos, onde se pode ter uma rápida absorção ou uma lenta absorção (GOODMAN, 1996).

1.4.2.2 Cloranfenicol

O cloranfenicol consiste um antibiótico de amplo espectro e altamente efetivo, pertencente à classe dos anfenicóis, que foi isolado pela primeira vez em *Streptomyces venezuelae* (DURANTE-MANGONI *et al.*, 2009). É um antibiótico com classificação bacteriostática, que devido as suas sólidas propriedades de combater uma variedade de microrganismos aeróbios e anaeróbicos, tem sido empregado como medicamento de uso veterinário e humano.

Seu espectro de ação é amplo, sendo ativo *in vitro* contra muitas bactérias Gram-positivas e Gram negativas, tais como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Brucella sp.*, *Enterobacter aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* e *Klebsiella pneumoniae* (BOOTH; MCDONALD, 1992). Devido a presença de efeitos colaterais perigosos, como anemia aplástica ou aplasia medular, o uso do cloranfenicol é limitado na terapêutica humana como fármaco de última escolha para o tratamento de doenças nas quais os demais antibióticos, com menor risco toxicológico, são menos eficazes. Para fins veterinários, o cloranfenicol pode ser utilizado no tratamento de uma variedade de infecções,

entretanto, dado o potencial tóxico em humanos, o uso do cloranfenicol não é permitido em animais destinados à alimentação humana em muitos países (NEUHAUS; HURLUT; HAMMACK, 2007).

O cloranfenicol é um composto lipossolúvel que se difunde através da membrana celular e se liga à subunidade proteica 50S dos ribossomos das células de procariontes, de modo reversível, inibindo a síntese da proteína (JÚNIOR *et al.*, 2006).

1.4.2.3 Aceturato de diminazeno

O aceturato de diminazeno é um fármaco utilizado no controle de tripanossomoses, consiste em uma diamidina aromática que possui atividade tripanocida, babesicida e bactericida, principalmente contra *Brucella* sp. e *Streptococcus* sp..

O aceturato de diminazeno, por ter uma baixa incidência de resistência, é utilizado em substituição a outros tripanocidas contra tripanossomas resistentes a estes. Apesar de não ter o mecanismo de ação muito bem compreendido, sabe-se que o aceturato de diminazeno atua interferindo na glicólise anaeróbica e síntese de DNA e RNA dos parasitas, além de interferir também na atividade das isoenzimas e da Ca^{++} - ATPase (PEREGRINE, Andrew S, 1994). Estudos realizados, em animais, com o uso deste medicamento na dose de $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$, dose única indicada pelos fabricantes para equinos, bovinos, ovinos e caninos, ocorrendo o desaparecimento dos sinais clínicos em 24 h (BRENDER, 1991), demonstraram eficácia na primeira aplicação, retirando os parasitas do sangue periférico (TUNTASUVAN *et al.*, 2003).

Este tripanocida é o produto mais utilizado nas tripanossomoses de animais domésticos pois apresenta um índice terapêutico mais alto do que os outros fármacos, possui atividade contra tripanossomas resistentes à outros fármacos usados em bovinos e apresenta uma baixa incidência de resistência (PEREGRINE, A S; MAMMAN, 1993). A pentamidina é um agente antiprotozoário, similar ao aceturato de diminazeno, eficaz no tratamento da tripanossomíase, leishmaniose e algumas infecções fúngicas (NGUEWA *et al.*, 2005). A pentamidina, apesar de nunca ter sido utilizada na clínica como agente antimicrobiano, foi recentemente constatada por Stokes *et al.* (2017) como capaz de perturbar a membrana externa de bacilos Gram-negativos devido a sua interação com os lipopolissacarídeos presentes na membrana. Além disso, eles concluíram que a pentamidina, em combinação com

antimicrobianos tipicamente utilizados para cocos Gram-positivos, tinha atividade sinérgica *in vitro* contra diferentes bacilos Gram-negativos (STOKES *et al.*, 2017).

1.4.3 Combinação de compostos

A resistência adquirida e inerente das cepas bacterianas tem implicado nos tratamentos terapêuticos. Tendo em vista que a resistência bacteriana pode vir a se tornar inevitável, a indústria farmacêutica perdeu o interesse pela descoberta de novos antimicrobianos, levando em consideração os altos custos para ensaios clínicos e o longo período para conclusão de testes pré-clínicos e clínicos (MARTENS; DEMAIN, 2017). Devido a essas dificuldades econômicas e os obstáculos regulatórios, o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos tiveram uma queda drástica entre as décadas de 80 e 2010 (BARTLETT; GILBERT; SPELLBERG, 2013; PIDDOCK, 2012).

Além disso, a falta de clareza, burocracia, mudança nas regras regulatórias e a diferença das premissas dos estudos clínicos dos países entre si são outros empecilhos para a indústria. Essas modificações realizadas pela agência nos padrões de estudos clínicos torna a experimentação terapêutica clínica desafiadora, prova disso é que em 2019 apenas 4 medicamentos antibacterianos, de 48 novas moléculas propostas, foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo eles o recarbrio (associação de imipenem, cilastatina e relabactam), a pretomanida, a xenleta (lefamulina) e o fetroja (cefiderocol) (ANDREI; DROC; STEFAN, 2019).

A dificuldade em encontrar um tratamento ideal e eficaz para infecções causadas por alguns patógenos, a falta de desenvolvimento de novos antimicrobianos pela indústria farmacêutica (SPELLBERG; REX, 2013) e o rápido aumento da resistência a antimicrobianos em patógenos, tornam urgente a busca de abordagens para combater essas infecções. Sendo assim, muitas empresas farmacêuticas têm optado por retomarem o uso de antibióticos que foram abandonados ao longo do tempo, ao invés de buscar por novos antimicrobianos. Para tanto, uma das alternativas inclui o estudo de combinações entre compostos na tentativa de alcançar resultados de efeitos sinérgicos e significativos frente aos quadros de infecções. (OKDAH; PAGE; OLAITAN, 2018).

A combinação de duas classes diferentes de compostos pode resultar em atividade bactericida, que é significativamente maior do que a soma de ambos os

compostos sozinhos. Quando esse fenômeno é demonstrado, diz-se que a combinação é sinérgica. Se a combinação resultar em um efeito de piora, diz-se que é uma combinação antagônica. Um resultado menor que o sinérgico, mas não antagônico, é considerado indiferente ou aditivo (LORIAN, 2005).

O sinergismo pode ser avaliado *in vitro* por diferentes técnicas como *checkerboard* e *time-kill* (LANGEVELD *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2011). O *checkerboard* e o *time-kill* são metodologias utilizadas a fim de quantificar o efeito das combinações frente as cepas bacterianas *in vitro* (JACKSON; AGBOKE; NWOKE, 2009). O método de *checkerboard* avalia o efeito da combinação de antimicrobianos em diferentes concentrações, podendo ser decorrente da microdiluição em caldo semelhante ao utilizado para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (PILLAI; MOELLERING; ELIOPOULOS, 2005), enquanto que o *time-kill* avalia a atividade bactericida e a potência relacionada à atividade em função do tempo (BONAPACE *et al.*, 2002).

Como uma estratégia de tratamento, a utilização de antimicrobianos não usualmente empregados para o tratamento de certas infecções causadas por patógenos (YOUNIS; THANGAMANI; SELEEM, 2015) em associação com outros antimicrobianos vem sendo amplamente estudada. Stokes *et al.* (2017) constataram que a pentamidina em combinação com antimicrobianos tipicamente utilizados para cocos Gram-positivos, tinha atividade sinérgica *in vitro* contra diferentes bacilos Gram-negativos. Uma atividade sinérgica promissora, foi observada por Almaaytah *et al.* (2018) frente cepas Gram-positivas e Gram-negativas, durante a combinação de peptídeos com antimicrobianos convencionais.

Alguns estudos demonstram uma melhora e um aumento da eficácia de antibióticos na clínica, uma vez que sua atividade sinérgica foi confirmada *in vitro*, por meio da terapia combinatória, quando associados com compostos não antimicrobianos, como anti-inflamatórios, antipsicóticos, bioativos da natureza e óleos essenciais (BUSH; AVE; LOUIS, 2014; LANGEVELD *et al.*, 2014).

O sinergismo entre aminoglicosídeos já foi reportado anteriormente com β -lactâmicos. A associação de penicilina e estreptomicina foi relatada por Wolfe e Johnson (1974) contra isolados de *S. viridans*. A mesma combinação foi observada em outros estudos, que evidenciaram o sinergismo entre a estreptomicina e a penicilina contra alguns isolados (DURACK; PELLETIER; PETERSDORF, 1974; JAWETZ; V.R.C, 1950; OPLINGER; WAGNER; CAVENDER, 2015) Corroborando

com o sinergismo *in vitro* entre aminoglicosídeos e β -lactâmicos, estudos clínicos de endocardite tratados pela combinação de penicilina e SMA foram relatados em 1950 (CATES; CHRISTIE; GARROD, 1951). A mesma combinação também foi descrita por Almquist et al. (1951) em estudos *in vivo*, em que a junção do β -lactâmico e do aminoglicosídeo demonstrou atividade significativa no controle bacteriano presente.

Na literatura, existem relatos de sinergismo entre o cloranfenicol e extrato de planta capaz de inibir diversas bactérias, incluindo *E. coli*, *K pneumoniae* e *S. aureus* (STEFANOVIC; STANOJEVI; OMI, 2012). A combinação de cloranfenicol com peptídeos também foi observada por Park et al. (2006) contra cepas de *S. aureus*. A combinação de cloranfenicol com produtos naturais também foi evidenciada por (BETONI *et al.*, 2006) que verificou o sinergismo contra *S. aureus* com 8 extratos de plantas. Recentemente, um relato de sinergismo de aceturato de diminazeno com clofazimina foi observado por Tuvshintulga (2017) contra *T. equi*, além de efeitos aditivos no crescimento *in vitro* de *B. bovis*, *B. bigemina* e *B. caballii*. Os relatos na literatura de combinações com aceturato de diminazeno são escassos.

As terapias de combinações antimicrobianas melhoram a efetividade, proporcionam uma terapia de amplo espectro e previnem o aparecimento de microrganismos resistentes (DRAGO *et al.*, 2007) além de reduzirem o tempo, custo e risco associados ao desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação do potencial antimicrobiano de peptídeos bioprospectados do solo do Cerrado, além da avaliação do potencial antimicrobiano livre e em combinação de estreptomicina, cloranfenicol e aceturato de diminazeno frente a cepas bacterianas *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Prospectar e sintetizar peptídeos antimicrobianos do solo utilizando a metaproteômica associada a algoritmos de predição;
- identificar a concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos antimicrobianos sintetizados;
- identificar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos estreptomicina, cloranfenicol e aceturato de diminazeno;
- avaliar a ocorrência do efeito sinérgico do tratamento pela comparação dos resultados da terapia combinada entre estreptomicina/cloranfenicol e aceturato de diminazeno em relação à monoterapia;
- determinar a cinética de ação das combinações estreptomicina e aceturato de diminazeno e cloranfenicol e aceturato de diminazeno frente às bactérias (*time kill*).

3 METODOLOGIA

3.1 BIOPROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS A PARTIR DO SOLO

3.1.1 Coleta e extração de proteínas

Para este estudo foi utilizado solo nativo do Cerrado. O material foi coletado na Embrapa Cerrados, localizada em Planaltina, DF (latitude: -15.605, longitude: -47.7142). Para a extração de proteínas e máxima remoção dos ácidos húmicos, dois protocolos foram utilizados. Para a primeira extração, foi utilizado o protocolo descrito por Chourey et al. (2010) para tanto, 100 mg de solo foi homogeneizado em 1 mL de tampão de extração (SDS 5%, Tris-HCl 50 mM pH 8.5, NaCl 0.15 M, EDTA 0.1 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 50 mM). Posteriormente, as amostras foram agitadas e imersas rapidamente em água a 100 °C para lise celular e inativação das proteases, seguido de resfriamento e centrifugação por 10 min a 2.095 x g. A fase superior foi transferida para um novo tubo, as proteínas foram precipitadas em TCA 25% e lavadas com acetona 80%. Em seguida, o *pellet* passou por uma nova extração, utilizando o protocolo descrito por Villeth et al. (2009). O *pellet* foi homogeneizado em 750 µL de tampão de extração (sacarose 0,7 M, Tris HCl 0,5 M, HCl 30 mM, EDTA 50 mM, KCl 0,1 M, DTT 40 mM). A extração foi à base de fenol equilibrado em pH 8.0. Posteriormente, as amostras foram agitadas por 15 min com o auxílio de um agitador e centrifugadas a 10.000 x g por 3 min. A fase superior foi transferida para um novo tubo e extraído mais duas vezes com tampão de extração. As proteínas foram precipitadas em acetato de amônio 0,1 M em metanol e lavadas com acetona 80%.

3.1.2 Solubilização e digestão das proteínas

As proteínas extraídas foram solubilizadas com 60 µL de bicarbonato de amônio a 50 mM (NH₄HCO₃ pH 8,5). Em seguida, 25 µL de *RapiGestTM SF – Waters* (0,2% v/v) foi acrescentado. As amostras foram aquecidas a 80°C por 15 min, sob agitação e, 2,5 µL de dithiothreitol a 100 mM foi adicionado. As amostras foram novamente aquecidas a 60°C por 30 min e permaneceram à temperatura ambiente até o resfriamento. Foi acrescentado 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM e então, as

amostras permaneceram à temperatura ambiente por 30 min. Para digestão das proteínas, 40 μL de solução contendo 200 ng de tripsina foram acrescentados, seguido de incubação em estufa a 37 °C por 19 h. Após o período de incubação, foi adicionado 10 μL de ácido trifluoracético 5% e as amostras foram incubadas a 37 °C por 90 min. Em seguida, foram centrifugadas a 10 °C por 30 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e seco em centrífuga a vácuo. Para a quantificação das proteínas, o *pellet* formado foi solubilizado em 50 μL de água mili-Q e quantificado utilizando *Qubit® Fluorometer*.

3.1.3 Dessalinização das amostras

As amostras foram dessalinizadas de acordo com o protocolo descrito por Rappsilber (2007) com modificações. Inicialmente, foi realizado o preparo das ponteiros (P200 μL) com discos Empore® C18, contendo um disco cada ponteira. Em seguida, as ponteiros contendo os discos foram lavadas com 20 μL de metanol, centrifugadas a 2.000 x g por 30s (as ponteiros foram centrifugadas com o auxílio de microtubos de 1,5 mL). Posteriormente, foram acrescentados 20 μL de resina POROS® R2 em solvente B (Ácido fórmico 0,1%, acetonitrila 98%) e as ponteiros foram centrifugadas a 2000 x g por 30 s. Duas lavagens com 20 μL de solvente A (Ácido fórmico 0,1%, acetonitrila 2%) seguidas de centrifugação foram realizadas em cada ponteira. Após o preparo das ponteiros, as amostras foram solubilizadas em solvente A, inseridas nas ponteiros e centrifugadas a 2.000 x g por 2 min. As amostras solubilizadas foram eluídas com 20 μL de solvente B e secas em centrífuga a vácuo por 45 min. Em seguida, foram solubilizadas com ácido fórmico 0,1% e injetadas no ESI LC-MS/MS.

3.1.4 Análise dos peptídeos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS)

Após a digestão triptica e dessalinização, os peptídeos foram aplicados em cromatógrafo líquido (Dionex Ultimate 3000 nano). Um total de 3 μg da mistura de peptídeos foram injetados em uma coluna de aprisionamento (*trap-column*) com 3 cm x 100 μm , contendo partículas de C18 5 μm para concentração. Em seguida, os peptídeos foram eluídos da *trap-column* para uma coluna analítica (32 cm x 75 μm ,

C18 3 μm) em gradiente crescente de acetonitrila de 7 a 35% durante 3h sob fluxo constante de 230 nL/min. Posteriormente os peptídeos foram destinados a fonte de ionização do espectrômetro. As frações eluídas diretamente na fonte de ionização do espectrômetro de massa do tipo Orbitrap Elite foram analisadas em modo DDA (*data-dependent acquisition*), gerando espectros MS1 no analisador Orbitrap (com resolução de 120.000 FWHM a 400m/z) entre as massas 350-1650 m/z. Para cada espectro MS1, foram definidos automaticamente os 20 íons mais intensos com cargas acima de dois e direcionados a fragmentação por CID (colisão induzida por dissociação) com o ganho automático controle de 1×10^6 e tempo de preenchimento máximo (máximo TI) de 120 ms. A configuração determinada para CID consistiu na: detecção por *ion trap*, janela de isolamento de 2.0 m/z em 20s, com ganho automático controle de 5×10^4 , máximo TI de 100 ms, com energia de colisão normalizada em 35% e limiar para a seleção de 3000.

3.1.5 Seleção dos peptídeos

Os peptídeos foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa e uma lista de peptídeos foi gerada. Os peptídeos identificados a partir do solo foram submetidos a dois algoritmos de predição de peptídeos antimicrobianos (PAMs). O primeiro algoritmo, *sense the moment*, desenvolvido pelo Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília (dados não publicados), baseado no modelo linguístico proposto por Loose et al. (2006) prediz os peptídeos com base em 3 escalas de momento hidrofóbico. O segundo algoritmo, preditor do CAMP (*Collection of Antimicrobial Peptides*), que possui uma maior sensibilidade, prediz os peptídeos baseado na sequência (WAGHU et al., 2016).

3.1.6 Síntese dos peptídeos e confirmação da identidade por espectrometria de massa

Após a escolha *in silico* das sequências peptídicas, os peptídeos selecionados foram sintetizados através de um protocolo de síntese química, purificados (> 95%) e liofilizados pela empresa brasileira Aminotech. A síntese foi realizada de acordo com

a metodologia em fase sólida F-moc (envolve o uso de 9- fluorenilmetoxicarbonila protetor do grupo amino). A verificação de massas moleculares e o grau de pureza dos peptídeos sintetizados foi realizada utilizando espectrometria de massa. Os peptídeos foram dissolvidos em um volume mínimo de água, misturados com uma solução saturada de ácido matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico (1:3). As amostras foram secas à temperatura ambiente sobre uma placa de MALDI-ToF. A solução de ácido matriz foi preparada em H₂O:ACN:TFA (50:50:0,3).

3.1.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.1.7.1 Microrganismos

Para a realização dos testes de atividade antimicrobiana *in vitro*, foram utilizadas cepas ATCC de *Escherichia coli* (ATCC 8798) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As cepas foram semeadas em ágar Mueller Hinton e armazenadas na geladeira por no máximo sete dias.

3.1.7.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi empregado o método de microdiluição em caldo. Uma colônia isolada foi inoculada em caldo Mueller Hinton, incubada a 37°C sob agitação durante 18h e ajustada para obtenção de uma concentração de 1×10^6 UFC.mL⁻¹. Foram realizadas diluições seriadas com os peptídeos em um volume de 50 μ L e em seguida foram adicionados 50 μ L de suspensão bacteriana contendo 10^6 células na fase logarítmica de crescimento em cada poço, para que ao final as concentrações variassem de 256 μ g.mL⁻¹ a 2 μ g.mL⁻¹. Em seguida a placa foi levada para estufa à 37° C por 24 h. A inibição do crescimento bacteriano foi demonstrada por densidade óptica utilizando um leitor de microplacas e um comprimento de onda de 595 nm. A menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano foi definida como a CIM. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA COMBINAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

3.2.1 Microrganismos

Para a realização dos testes de atividade antimicrobiana *in vitro* da combinação de antimicrobianos, foram utilizados isolados clínicos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* e cepas ATCC (Tabela 2). Os microrganismos foram previamente identificados por meio de análise utilizando MALDI *Byotiper 3*, que identifica microrganismos através do MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight*). Os microrganismos foram semeados em ágar Mueller Hinton e armazenados na geladeira por no máximo sete dias.

Tabela 2 – Relação dos isolados utilizados nos experimentos *in vitro*.

Nome do isolado	Origem	Característica
<i>E. coli</i> 89	Fezes (Animal)	Resistência a eritromicina (CIM >8 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> 94	Fezes (Animal)	Resistência a penicilina (CIM >4 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> 95	Fezes (Animal)	Resistência a penicilina (CIM >4 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> 96	Fezes (Animal)	Resistência a tetraciclina (CIM >8 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> KPC+ 002101123	Isolado humano	Resistência a gentamicina (CIM >8 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> ATCC 8739	ATCC	-
<i>E. coli</i> 3789319	Isolado humano	Resistência a gentamicina (CIM >8 µg.mL ⁻¹) e tetraciclina (CIM >8 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> KPC+ 001812446	Isolado humano	Resistência a gentamicina (CIM >8 µg.mL ⁻¹) e ampicilina (CIM >16 µg.mL ⁻¹)
<i>K. pneumoniae</i> 3259271	Isolado humano	Resistência a ampicilina (CIM >16 µg.mL ⁻¹) e tetraciclina (CIM >8 µg.mL ⁻¹)
<i>K. pneumoniae</i> 001789769	Isolado humano	Resistência a gentamicina (CIM >8 µg.mL ⁻¹) e ampicilina (CIM >16 µg.mL ⁻¹)
<i>K. pneumoniae</i> 001450421	Isolado humano	Resistência a gentamicina (CIM >8 µg.mL ⁻¹)
<i>S. aureus</i> 111	Leite bovino	Resistência a neomicina (CIM >4 µg.mL ⁻¹)
<i>S. aureus</i> 117	Leite bovino	Resistência a polimixina (CIM >16 µg.mL ⁻¹)
<i>S. aureus</i> 118	Leite bovino	Resistência a neomicina (CIM >4 µg.mL ⁻¹)
<i>S. aureus</i> 003730529	Isolado humano	Resistência a eritromicina (CIM >4 µg.mL ⁻¹)
<i>S. aureus</i> 7133623	Isolado humano	Resistência a ampicilina (CIM >8 µg.mL ⁻¹)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	ATCC	-

Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

3.2.2 Agentes antimicrobianos

Para a realização dos testes de sensibilidade, foram utilizadas as drogas antibacteriana estreptomicina e cloranfenicol em combinação com o aceturato de diminazeno. Foram preparadas soluções estoque de 5 mg.mL^{-1} para cada um dos antimicrobianos. Para os ensaios de combinação (*checkerboard*) e determinação da concentração mínima inibitória, as soluções dos antimicrobianos foram diluídas para que a concentração inicial fosse $200 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e, após diluição seriada (6 diluições), a concentração final fosse de $3,12 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, em algumas cepas variando pra mais ($400 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) ou pra menos ($1,56 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$).

3.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

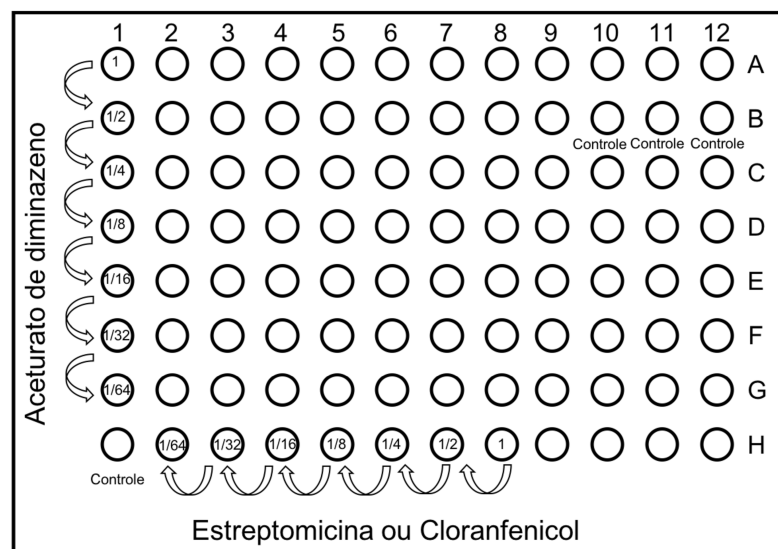
Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi empregado o método de microdiluição em caldo. Uma colônia isolada foi inoculada em caldo Mueller Hinton, incubada a 37°C sob agitação durante 18h e ajustada para obtenção de uma concentração de $1 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$. Foram realizadas diluições seriadas com os antimicrobianos em um volume de $50 \text{ }\mu\text{L}$ e em seguida foram adicionados $50 \text{ }\mu\text{L}$ de suspensão bacteriana contendo 10^6 células na fase logarítmica de crescimento em cada poço, para que ao final as concentrações variassem de $200 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ a $3,12 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, em algumas cepas variando pra mais ($400 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) ou pra menos ($1,56 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). Em seguida a placa foi levada para estufa à 37°C por 24 h. A inibição do crescimento bacteriano foi demonstrada por densidade óptica utilizando um leitor de microplacas e um comprimento de onda de 595 nm. A menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano foi definida como a CIM. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3.2.4 Ensaio *checkerboard*

Para avaliar o efeito sinérgico do antibiótico estreptomicina e aceturato de diminazeno frente a cepas de *E. coli* e *S. aureus*, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo com modificações para o ensaio *checkerboard* (PILLAI; MOELLERING; ELIOPOULOS, 2005). As suspensões de bactéria foram

padronizadas a uma concentração de 1×10^6 UFC.mL⁻¹, a qual foi utilizada no ensaio. Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com a mistura dos antimicrobianos em diferentes concentrações e inoculados com as suspensões de bactéria. As microplacas foram incubadas por 24 h à 37°C e após esse período foi realizada a leitura visual do crescimento bacteriano e a leitura com o leitor de microplacas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 3 – Representação do método *checkerboard*, utilizado para avaliação do sinergismo entre os antimicrobianos.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

A interpretação das interações foi realizada através do cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) de acordo com a seguinte equação:

$$ICIF = \frac{CIM \text{ estreptomicina/cloranfenicol em combinação}}{CIM \text{ estreptomicina/cloranfenicol}} + \frac{CIM \text{ aceturato em combinação}}{CIM \text{ aceturato}}$$

A partir do ICIF obtido foi avaliada a interação seguindo a classificação descrita por Bonapace et al. (2002) na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores do ICIF correspondentes as diferentes interações segundo Bonapace, 2002. ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada; CIF: Concentração Inibitória Fracionada.

Interação	ICIF
Sinérgica	$CIF \leq 0,5$
Indiferente	$0,5 < CIF \leq 4$
Antagônica	$CIF > 4$

Fonte: Bonapace (2002).

3.2.5 Avaliação da cinética de ação bactericida (*time-kill*)

O ensaio de *time-kill* das combinações dos antimicrobianos e dos peptídeos foi avaliada frente as cepas de *E. coli* que apresentaram o melhor resultado de sinergismo. Cultivos bacterianos em fase de crescimento exponencial foram centrifugados (1.000 g, 10 min, 4 °C), lavados três vezes com PBS (fosfato de potássio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,3), e em seguida ressuspensos em PBS para obtenção de uma concentração de 1×10^6 UFC mL⁻¹. Esta suspensão bacteriana foi incubada a 37 °C com PBS contendo os antimicrobianos (1:1). Alíquotas de 10 µL foram retiradas em diferentes tempos, diluídas em meio Mueller Hinton, plaqueadas em ágar Mueller Hinton e incubadas por 18h a 37 °C para obtenção de valores de UFC (ABBASSI *et al.*, 2013; RAMLI *et al.*, 2017).

4 RESULTADOS

4.1 BIOPROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS A PARTIR DO SOLO

4.1.1 Seleção de peptídeos

As proteínas foram extraídas das amostras do solo do Cerrado, solubilizadas, dessalinizadas e preparadas para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). A análise por espectrometria de massas gerou uma lista de 467 sequências de peptídeos que foram identificadas nas amostras. Estes peptídeos foram submetidos a dois algoritmos de predição a fim de identificar peptídeos com possível atividade antibacteriana. O primeiro algoritmo, desenvolvido pelo grupo de pesquisa, identificou 185 desses 467 como possíveis peptídeos antimicrobianos. Estes 185 selecionados foram submetidos ao algoritmo do CAMP, que possui uma maior sensibilidade, a fim de restringir o número de peptídeos. 14 peptídeos foram identificados como peptídeos antimicrobianos, e destes, 7 foram selecionados (Tabela 4) para síntese levando em consideração alguns parâmetros, como tamanho, carga e fator de agregação.

Tabela 4 – Peptídeos selecionados a partir da prospecção do solo do Cerrado por metaproteômica associada a algoritmos de predição para síntese e avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*.

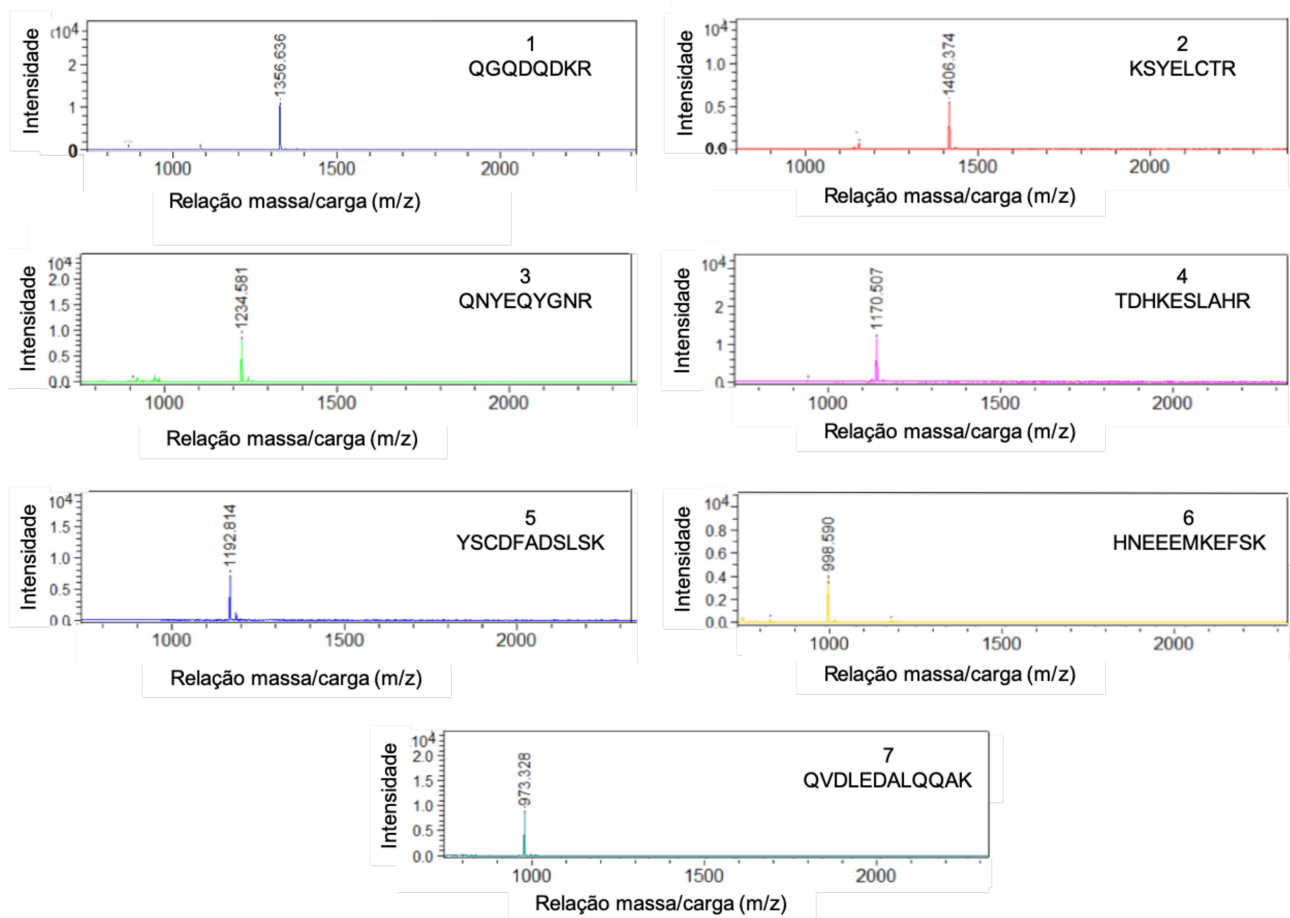
Peptídeos	Sequência	Tamanho	Carga	Fator de agregação
1	QGQDQDKR	8	0	- 131,1
2	KSYELCTR	8	+ 1	- 12,8
3	QNYEQYGNR	9	0	- 61,8
4	TDHKESLAHR	10	0	- 64,5
5	YSCDFADSLSK	11	- 1	- 19,2
6	HNEEEMKEFSK	11	- 2	- 72,9
7	QVDLEDALQQAK	12	- 2	- 49,4

Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

4.1.2 Confirmação da pureza dos peptídeos

A pureza dos peptídeos sintetizados foi confirmada por espectrometria de massa, a fim de assegurar a eficácia dos ensaios biológicos. Os espectros obtidos (Figura 4) indicaram um excelente grau de pureza, não sendo, portanto, necessária a purificação dos mesmos.

Figura 4 – Espectros de massas dos peptídeos sintetizados a partir da metaproteômica do solo do Cerrado associada a algoritmos de predição gerados no equipamento MALDI-ToF obtidos no modo de ionização positiva, usando o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

4.1.3 Atividade antimicrobiana dos peptídeos determinada pelo método de microdiluição

A atividade antimicrobiana dos peptídeos foi avaliada contra cepas bacterianas, sendo uma Gram-negativa e uma Gram-positiva, *E. coli* ATCC 8739 e *S. aureus* ATCC 25923, respectivamente, e assim foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) frente a cada microrganismo. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Os resultados obtidos mostram que os peptídeos não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano em concentrações de até 256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, maior dose testada no estudo. É possível que em concentrações maiores esses peptídeos tenham atividade antibacteriana, mas visando o objetivo do presente estudo, de encontrar estratégias para o controle bacteriano, concentrações muito altas destes peptídeos tornariam o processo dispendioso e, portanto, inviável economicamente.

Tabela 5 – Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos peptídeos 1 a 7, sintetizados a partir da bioprospecção do solo do Cerrado por metaproteômica, contra *E. coli* e *S. aureus* pelo método de microdiluição. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Peptídeos	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)						
	1	2	3	4	5	6	7
Microrganismo							
<i>E. coli</i> ATCC 8739	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256

Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

4.2 COMBINAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

4.2.1 Atividade antimicrobiana determinada pelo método de microdiluição

A atividade antimicrobiana dos três antimicrobianos foi avaliada contra cepas bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas, e assim foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) frente a cada microrganismo. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Os resultados obtidos mostram que o aceturato de diminazeno foi capaz de inibir todas as cepas com CIM variando entre 25 – 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo as cepas de *K.*

pneumoniae menos sensíveis a este antimicrobiano. A estreptomicina, por sua vez, se mostrou um agente antimicrobiano promissor contra as bactérias Gram-positivas testadas, visto que a CIM foi $< 3,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$, já para as bactérias Gram-negativas a CIM variou de $6,25 - 400 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Com relação ao cloranfenicol, a CIM variou de $6,25 - 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo mais eficaz contra algumas cepas de *E. coli* e menos eficaz contra uma cepa de *K. pneumoniae*.

Tabela 6 – Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos antimicrobianos aceturato de diminazeno, estreptomina e cloranfenicol contra isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus* pelo método de microdiluição. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Microrganismo	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
	Aceturato	Estreptomina	Cloranfenicol
Bactérias Gram-negativas			
Isolados animais			
<i>E. coli</i> 89	25,00	25,00	12,50
<i>E. coli</i> 94	50,00	50,00	25,00
<i>E. coli</i> 95	50,00	50,00	12,50
<i>E. coli</i> 96	25,00	50,00	25,00
Isolados humanos e ATCC			
<i>E. coli</i> KPC+ 002101123	25,00	50,00	6,25
<i>E. coli</i> ATCC 8739	50,00	25,00	6,25
<i>E. coli</i> 3789319	25,00	50,00	>200,00
<i>E. coli</i> KPC+ 001812446	100,00	100,00	>200,00
<i>K. pneumoniae</i> 3259271	200,00	6,25	50,00
<i>K. pneumoniae</i> 001789769	400,00	100,00	6,25
<i>K. pneumoniae</i> 001450421	400,00	400,00	>400,00
Bactérias Gram-positivas			
Isolados animais			
<i>S. aureus</i> 111	50,00	<1,56	25,00
<i>S. aureus</i> 117	50,00	<1,56	25,00
<i>S. aureus</i> 118	50,00	<1,56	6,25
Isolados humanos e ATCC			
<i>S. aureus</i> 003730529	>200,00	<3,12	100,00
<i>S. aureus</i> 7133623	100,00	<3,12	100,00
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	200,00	<3,12	12,50

Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

4.2.2 Atividade sinérgica determinada pelo método *checkerboard*

Os valores da CIM obtidos pela combinação do aceturato de diminazeno com estreptomina e cloranfenicol estão listados nas Tabelas 7 e 8. A CIM do aceturato de diminazeno ($25 - 400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a atividade antibacteriana dos agentes antimicrobianos. A atividade sinérgica foi detectada pela diminuição do valor da CIM dos antimicrobianos na combinação, quando comparados à CIM livre, e determinada pela $\text{CIF} \leq 0,5$.

A combinação do aceturato de diminazeno com a estreptomicina apresentou sinergismo para quase todas as bactérias Gram-negativas, com CIF variando de 0,09 – 0,37 (Tabela 7). Nesta associação houve redução da CIM da estreptomicina para 1/32 da CIM livre para a cepa *E. coli* 94, demonstrando a maior eficácia. As cepas de *K. pneumoniae* 3259271 e 001450421, apesar de terem apresentado redução da CIM para os antimicrobianos, apresentaram efeito indiferente com CIF de 0,51 e 0,62, respectivamente. Para as bactérias Gram-positivas, esta combinação não foi muito eficaz, visto que todas as cepas foram sensíveis à estreptomicina com CIM livre < 1,56. Não foi possível observar redução da CIM para nenhum dos antimicrobianos utilizados nesta combinação.

Tabela 7 – Efeito sinérgico in vitro da combinação de aceturato de diminazeno e estreptomicina pelo método checkerboard contra isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Os experimentos foram realizados em triplicata. CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; A: aceturato de diminazeno; E: estreptomicina; S: sinérgico; I: indiferente.

Microrganismo	Concentração inibitória mínima (µg.mL ⁻¹)				Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF)			
	CIM livre		CIM em combinação		CIF A	CIF E	ΣCIF	Interpretação
	CIM A	CIM E	CIM A	CIM E				
Bactérias Gram-negativas								
Isolados animais								
<i>E. coli</i> 89	25,00	25,00	6,25	1,56	0,25	0,06	0,31	S
<i>E. coli</i> 94	50,00	50,00	3,12	1,56	0,06	0,03	0,09	S
<i>E. coli</i> 95	50,00	50,00	3,12	3,12	0,06	0,06	0,12	S
<i>E. coli</i> 96	25,00	50,00	3,12	6,25	0,12	0,12	0,24	S
Isolados humanos								
<i>E. coli</i> KPC+ 002101123	25,00	50,00	6,25	6,25	0,25	0,12	0,37	S
<i>E. coli</i> ATCC 8739	50,00	25,00	6,25	3,12	0,12	0,12	0,24	S
<i>E. coli</i> 3789319	25,00	50,00	6,25	6,25	0,25	0,12	0,37	S
<i>E. coli</i> KPC+ 001812446	100,00	100,00	3,12	12,50	0,03	0,12	0,15	S
<i>K. pneumoniae</i> 3259271	200,00	6,25	3,12	3,12	0,01	0,50	0,51	I
<i>K. pneumoniae</i> 001789769	400,00	100,00	50,00	12,50	0,12	0,12	0,24	S
<i>K. pneumoniae</i> 001450421	400,00	400,00	50,00	200,00	0,12	0,50	0,62	I
Bactérias Gram-positivas								
Isolados animais								
<i>S. aureus</i> 111	50,00	<1,56	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 117	50,00	<1,56	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 118	50,00	<1,56	-	-	-	-	-	-
Isolados humanos								
<i>S. aureus</i> 003730529	>200,00	<1,56	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 7133623	100,00	<1,56	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	200,00	<1,56	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

A combinação do aceturato de diminazeno com o cloranfenicol apresentou sinergismo para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Tabela 8). Esta combinação demonstrou uma maior eficácia contra a cepa *E. coli* KPC+ 001812446, onde o cloranfenicol apresentou uma redução de 1/16 da CIM, o aceturato de dimiazeno uma redução de 1/32 e o CIF foi de 0,09. Outra cepa que obteve uma redução significativa da CIM foi a *S. aureus* 003730529, em que o cloranfenicol apresentou uma CIM de 1/32 quando comparado com a CIM livre e um CIF de 0,28.

Tabela 8 – Efeito sinérgico da combinação de aceturato de diminazeno e cloranfenicol pelo método checkerboard contra isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Os experimentos foram realizados em triplicata. CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; A: aceturato de diminazeno; C: cloranfenicol; S: sinérgico; I: indiferente

Microrganismo	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				Índice de concentração inibitória fracionada (ICIF)			Interpretação
	CIM livre		CIM em combinação		CIF A	CIF C	Σ CIF	
	CIM A	CIM C	CIM A	CIM C				
Bactérias Gram-negativas								
Isolados animais								
<i>E. coli</i> 89	25,00	12,50	6,25	6,25	0,25	0,50	0,75	I
<i>E. coli</i> 94	50,00	25,00	12,50	6,25	0,25	0,25	0,50	S
<i>E. coli</i> 95	50,00	12,50	6,25	6,25	0,12	0,50	0,62	I
<i>E. coli</i> 96	25,00	25,00	6,25	6,25	0,25	0,25	0,50	S
Isolados humanos								
<i>E. coli</i> KPC+ 002101123	25,00	6,25	25,00	6,25	1,00	1,00	2,00	I
<i>E. coli</i> ATCC 8739	50,00	6,25	25,00	3,12	0,50	0,50	1,00	I
<i>E. coli</i> 3789319	25,00	>200,00	12,50	3,12	0,50	0,01	0,51	I
<i>E. coli</i> KPC+ 001812446	100,00	>200,00	3,12	12,50	0,03	0,06	0,09	S
<i>K. pneumoniae</i> 3259271	200,00	50,00	50,00	12,50	0,25	0,25	0,50	S
<i>K. pneumoniae</i> 001789769	400,00	6,25	100,00	3,12	0,25	0,50	0,75	I
<i>K. pneumoniae</i> 001450421	400,00	>400,00	50,00	200,00	0,12	0,50	0,62	I
Bactérias Gram-positivas								
Isolados animais								
<i>S. aureus</i> 111	50,00	12,50	6,25	3,12	0,12	0,25	0,36	S
<i>S. aureus</i> 117	50,00	25,00	12,50	6,25	0,25	0,25	0,50	S
<i>S. aureus</i> 118	50,00	6,25	25,00	3,12	0,50	0,50	1,00	I
Isolados humanos								
<i>S. aureus</i> 003730529	>200,00	100,00	50,00	3,12	0,25	0,03	0,28	S
<i>S. aureus</i> 7133623	100,00	100,00	50,00	25,00	0,50	0,25	0,75	I
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	200,00	12,50	25,00	3,12	0,12	0,25	0,37	S

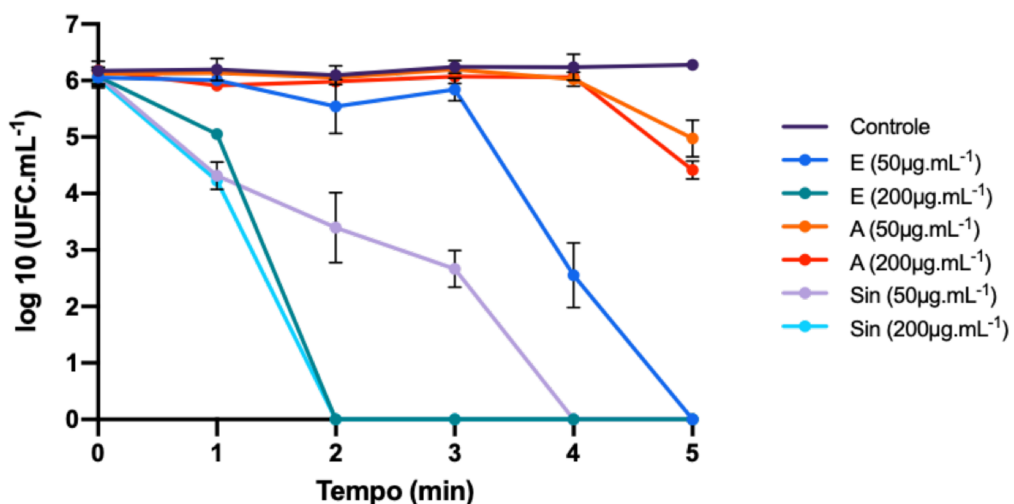
Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

4.2.3 Ensaio *time-kill*

O ensaio *time-kill* foi realizado com as combinações para determinar em quanto tempo os antimicrobianos agem inibindo o crescimento da cepa. A cepa *E. coli* 94, que obteve o melhor efeito sinérgico para as duas combinações, foi utilizada. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 5 e 6.

Como resultado deste teste foi observado, para a combinação de aceturato de diminazeno e estreptomicina (Figura 5), que em concentrações mais baixas (1xCIM; 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a combinação é capaz de inibir o crescimento da bactéria em menor tempo que o antibiótico livre, significando que o aceturato de diminazeno é capaz de potencializar a atividade antibacteriana da estreptomicina. Por outro lado, quando as concentrações são elevadas (4xCIM; 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), não é possível observar uma diferença no tempo de ação entre o antibiótico livre e em combinação.

Figura 5 – Cinética de crescimento em função do tempo para a combinação aceturato de diminazeno x estreptomicina frente à cepa *E. coli* 94, onde estreptomicina é representada pela letra E, aceturato de diminazeno pela letra A e a combinação pela sigla Sin. O controle foi realizado em ausência dos antimicrobianos. Os resultados são expressos como a média dos valores representativos de um experimento realizado em triplicata

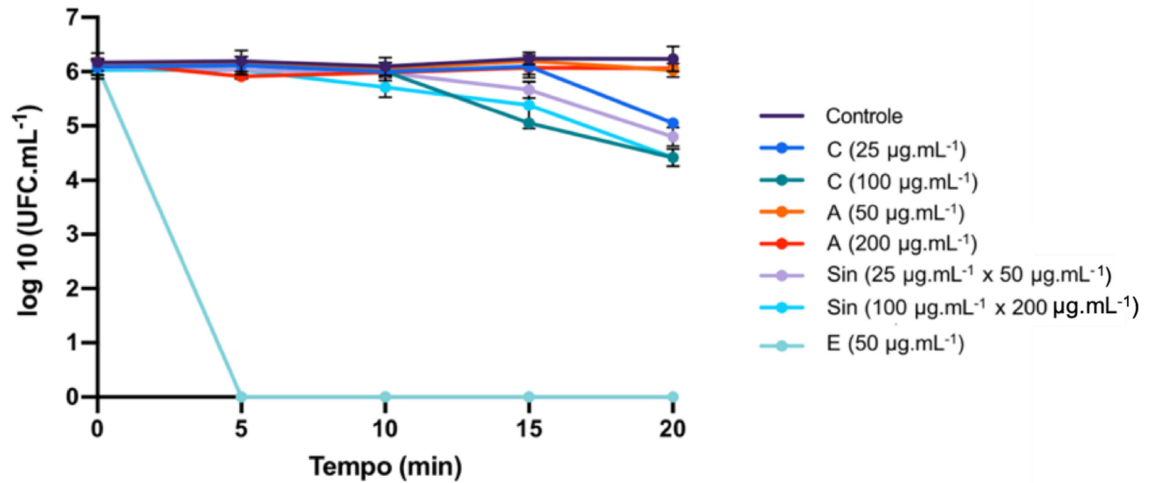


Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

Para a segunda combinação, aceturato de diminazeno e cloranfenicol (Figura 6), não foi observada a inibição do crescimento da bactéria dentro do período de 20 min, não sendo possível inferir o tempo necessário para que o antibiótico livre

tenha efeito e nem se existe diferença no tempo de ação entre o antibiótico livre e em combinação.

Figura 6 – Cinética de crescimento em função do tempo para a combinação aceturato de diminazeno x cloranfenicol frente à cepa *E. coli* 94, onde cloranfenicol é representado pela letra C, aceturato de diminazeno pela letra A e a combinação pela sigla Sin. O controle foi realizado em ausência dos antimicrobianos e estreptomocina 1 x CIM foi utilizada como controle positivo. Os resultados são expressos como a média dos valores representativos de um experimento realizado em triplicata



Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

5 DISCUSSÃO

Com o rápido aumento na incidência de infecções e de bactérias resistentes a múltiplas drogas e a descontinuidade na pesquisa de novas drogas pela indústria farmacêutica, existe a necessidade da busca por novas alternativas de tratamento. Tendo em vista essa busca por novos tratamentos frente a crescente incidência de infecções, o presente estudo avaliou o potencial antimicrobiano de peptídeos sintetizados a partir de estudos *in silico* e a atividade antimicrobiana de estreptomicina, cloranfenicol e aceturato de diminazeno, sozinhos e em combinação, contra cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*.

Os peptídeos têm sido considerados como potentes candidatos para a geração de novos antimicrobianos, oferecendo uma alternativa interessante para abordar o crescente problema das infecções e da resistência aos antibióticos. O mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos ainda não está completamente elucidado, podendo apresentar diferentes formas de ação. Há diversas explicações para que sejam capazes de eliminar bactérias multirresistentes. Suas propriedades catiônicas e hidrofóbicas permitem que eles participem da imunidade inata reconhecendo e inativando microrganismos aniônicos (WANG *et al.*, 2015).

Apesar do grande potencial terapêutico, a aplicação dos PAMs de origem natural na clínica, é limitada (ZHANG; FALLA, 2006). Dentre os obstáculos para o uso de PAMs como agentes antimicrobianos, destaca-se o seu potencial de toxicidade. A maioria dos ensaios clínicos com peptídeos não utiliza a administração com efeito sistêmico, que corresponde ao mercado mais lucrativo, mas sim a aplicação tópica para o tratamento de infecções de superfície (KOSIKOWSKA *et al.*, 2016). Frente aos obstáculos da aplicação terapêutica dos PAMs, algoritmos de predição de atividade antimicrobiana têm sido utilizados para pré-seleção de sequências possivelmente antimicrobianas para testes *in vitro* e *in vivo*, proporcionando uma alternativa eficiente para o desenvolvimento de novos fármacos. Pesquisas recentes mostram que esta abordagem pode ser utilizada na predição, geração e/ou otimização de PAMs (PORTO; FENSTERSEIFER; FRANCO, 2014; PORTO; PIRES; FRANCO, 2012). Sendo assim, avaliou-se o potencial antimicrobiano de peptídeos sintetizados a partir de estudos *in silico*.

Parâmetros físico-químicos (carga, hidrofobicidade global, propensão helicoidal, anfipaticidade, etc.) são os principais moduladores efetivos para que ocorra a lise da membrana por meio de PAMs (TIAN *et al.*, 2009). Apesar de não ser uma garantia para que os peptídeos apresentem uma atividade antimicrobiana, o equilíbrio entre os parâmetros físico-químicos pode ser necessário para que exista uma atividade eficiente (GIANGASPERO; SANDRI; TOSSI, 2001). As sequências dos peptídeos foram obtidas a partir da análise por espectrometria de massas de proteínas extraídas de amostras do solo do Cerrado, gerando 467 peptídeos com grande variedade de massa, tamanho e composição. Os fragmentos foram analisados individualmente, levando em conta a observação de características que podem auxiliar na identificação daqueles com maior propensão em ser um PAM. Dentre estas características, destacam-se o tamanho, a carga e o fator de agregação. Buscou-se selecionar aqueles com maior probabilidade de apresentar essas características, tamanho < 20, carga preferencialmente positiva e fator de agregação baixo.

Estes peptídeos foram submetidos a dois algoritmos de predição a fim de identificar peptídeos com possível atividade antibacteriana. O primeiro algoritmo, desenvolvido pelo grupo de pesquisa, baseado no modelo linguístico proposto por Loose *et al.* (2006) que prediz os peptídeos com base em 3 escalas de momento hidrofóbico, identificou 185 desses 467 como possíveis peptídeos antimicrobianos. Estes 185 selecionados foram submetidos ao algoritmo do CAMP, que possui uma maior sensibilidade e prediz os peptídeos com base na sequência (WAGHU *et al.*, 2016) a fim de restringir o número de peptídeos. Após a análise pelos dois algoritmos de predição, 14 peptídeos foram identificados como peptídeos antimicrobianos, e destes, 7 foram selecionados com base nas características previamente descritas.

Os sete peptídeos que passaram pelos processos descritos anteriormente foram sintetizados artificialmente e preparados de forma adequada para sua submissão aos testes *in vitro* para verificar a atividade antimicrobiana. Apesar de todos os peptídeos avaliados terem demonstrado potencial antimicrobiano a partir de avaliações *in silico* de suas sequências nos algoritmos de predição, os testes *in vitro* aqui desenvolvidos não geraram resultados que comprovassem atividade inibitória contra as cepas bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas testadas. Concentrações superiores a 256 µg.mL⁻¹, maior dose testada no estudo, e já bastante elevada, deixariam de ser industrialmente viáveis devido ao elevado custo de obtenção destes peptídeos.

Considerando que a primeira estratégia utilizada para o controle de bactérias patogênicas não se mostrou viável economicamente, foi avaliada outra abordagem que envolve a avaliação de sinergismo entre antimicrobianos. Dentre os antimicrobianos testados sozinhos, a estreptomicina foi a única que não apresentou um perfil de resistência para todas as cepas, inibindo o crescimento das cepas de *S. aureus* com CIM $< 3,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O efeito da estreptomicina sobre 62 cepas de *K. pneumoniae* KPC+ foi avaliado por Hu e colaboradores (2017), onde 98,4% apresentaram sensibilidade a estreptomicina, com CIM variando de 0,5 a $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A mesma sensibilidade foi relatada por Noriega (1975) onde 70% das cepas resistentes a gentamicina eram sensíveis a estreptomicina.

Apesar do cloranfenicol ter apresentado um valor de CIM reduzido para algumas cepas, variando de 6,25 a $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, encontra-se fora dos parâmetros de sensibilidade quando desafiado contra cepas de *K. pneumoniae* KPC+. Humphries et al. (2015) descreve que cepas de KPC+ devem ser consideradas sensíveis ao cloranfenicol quando a concentração necessária para inibir crescimento bacteriano for $\leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que não foi observado no presente estudo para nenhuma das cepas. Zavascki et al. (2017) ao avaliarem a atividade do cloranfenicol sobre 8 cepas de *K. pneumoniae* KPC+, observaram uma variação de CIM entre 16 e $> 256 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Livermore et al. (2011) por sua vez, também evidenciou a resistência de cloranfenicol em cepas de *K. pneumoniae* KPC+ com CIM $\geq 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para as cepas de *S. aureus*, a mesma capacidade de resistência ao cloranfenicol foi observada por Zuo et al. (2016) que detectaram 100% de resistência em todas as cepas de *S. aureus* testadas contra o mesmo antimicrobiano, exibindo CIM $> 32 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uma que os valores de *breakpoint* para cloranfenicol da EUCAST e do CLSI consideram patógenos sensíveis os que são inibidos em concentrações $\leq 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CLSI, 2015; EUCAST, 2014).

O aceturato de diminazeno, por sua vez, tem uma baixa incidência de resistência contra tripanossomas, e apesar de nunca ter sido utilizado na clínica para o controle de bactérias, Stokes et al. (2017) constataram que a pentamidina, um agente similar ao aceturato, foi capaz de perturbar a membrana de bacilos Gram-negativos ao interagir com os lipopolissacarídeos presentes na membrana. Quanto testado sozinho, o aceturato de diminazeno apresenta um perfil de resistência para todas as cepas, com CIM variando de 25 a $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A necessidade de concentrações elevadas para o tratamento desses microrganismos e a constante evidência da resistência aos antimicrobianos, enfraquece cada vez mais o uso de monoterapias como recurso terapêutico para essas infecções. Devido as limitações no tratamento de infecções causados por esses patógenos, o presente trabalho consistiu em avaliar o uso da terapia combinada.

O *checkerboard* e o *time-kill* são os métodos para avaliação do efeito de sinergismo, *in vitro*, mais utilizados na pesquisa de combinações de antimicrobianos. Ambos os métodos são complementares. Enquanto o *checkerboard* avalia a atividade inibitória, o *time-kill* avalia a atividade bactericida e a potência relacionada à atividade em função do tempo (BONAPACE *et al.*, 2002). Dados sobre sinergismo na literatura são escassos. Alguns estudos compararam métodos *in vitro* de fácil execução, como disco difusão, para detecção de sinergismo, como alternativa aos métodos *time-kill* e *checkerboard* (PANKEY; ASHCRAFT; DORNELLES, 2013; TAN *et al.*, 2011).

Ao avaliarmos as combinações propostas (estreptomicina + aceturato de diminazeno e cloranfenicol + aceturato de diminazeno), a estreptomicina associada com o aceturato de diminazeno mostrou melhor atividade antibacteriana e sinérgica contra as cepas Gram-negativas, não obtendo resultados para as cepas Gram-positivas. Relatos anteriores por Wolfe e Johnson (1974) apresentam sinergismo de estreptomicina com penicilina, *in vitro* e na clínica, contra isolados de *S. viridans*, em que a estreptomicina obteve redução de 40x a CIM (de 200 para 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), assim como outros estudos apresentam a mesma combinação e uma redução da CIM de estreptomicina (DURACK; PELLETIER; PETERSDORF, 1974; JAWETZ; V.R.C, 1950; OPLINGER; WAGNER; CAVENDER, 2015). A mesma associação de estreptomicina e penicilina foi observada por Oplinger *et al.* (2015) e obteve efeito sinérgico contra cepas de *Flavobacterium psychrophilum*, tendo uma redução de $>5000 \text{ mg.mL}^{-1}$ para $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ da CIM. Em um outro estudo, Stokes *et al.* (2017) concluiu que a pentamidina, agente antimicrobiano similar ao aceturato de diminazeno, atua como um adjuvante antibiótico capaz de sensibilizar bactérias Gram-negativas a antibióticos tipicamente restritos a bactérias Gram-positivas. Especificamente, contra *E. coli*, a pentamidina apresentou sinergismo com rifampicina, novobiocina e eritromicina, com CIF $\leq 0,5$.

Para a outra combinação, cloranfenicol associado com o aceturato de diminazeno, foi possível obter sinergismo para cepas Gram-negativas e Gram-positivas, com CIF $\leq 0,5$. Danesh *et al.* (2017) demonstrou sinergismo entre

cloranfenicol combinado com bacteriocinas contra isolados de *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Diferentemente do observado no presente estudo, Jawetz (1950) observou um efeito antagônico do cloranfenicol, quando associado à penicilina, contra 9 cepas de enterococcus. Esse antagonismo se deve, provavelmente, ao impedimento, pelo cloranfenicol, da síntese de autolisinas necessárias para a atividade bactericida dos antibióticos β -lactâmicos (TYERS; WRIGHT, 2019). Com relação a combinação com aceturato de diminazeno não existem outros relatos na literatura, o que fortalece e incentiva estudos como esse, visando a busca de estratégias novas para o controle de infecções bacterianas.

Baseado nos ensaios de *checkerboard*, a cepa que obteve o melhor sinergismo, com $CIF \leq 0,5$, para ambas as combinações foi submetida à análise da cinética de crescimento em função do tempo (*time-kill*), utilizando duas concentrações diferentes de cada antimicrobiano, separados e em combinação e a velocidade da ação bactericida foi monitorada pela contagem de UFC.

Em função dos resultados da cinética de morte, percebemos que a combinação de aceturato de diminazeno e estreptomicina, em concentrações mais baixas ($1 \times CIM$; $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) é capaz de inibir o crescimento da bactéria em menor tempo que o antibiótico livre, enquanto que em concentrações elevadas ($4 \times CIM$; $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), não é possível observar uma diferença no tempo de ação entre o antibiótico livre e em combinação, o que nos leva a pensar que o aceturato de diminazeno é capaz de potencializar a atividade antibacteriana da estreptomicina em concentrações baixas. Quando essas concentrações são elevadas, não é possível observar a ação potencializadora do aceturato, visto que o antibiótico por si só é capaz de agir sobre a bactéria inibindo o crescimento.

O aceturato de diminazeno quando em combinação com o cloranfenicol não demonstrou a inibição do crescimento da bactéria dentro do período de tempo observado (20 min). Isso se deve, provavelmente, ao fato do cloranfenicol ser um agente bacteriostático e necessitar de um tempo de ação um pouco maior, quando comparado com a estreptomicina. Apesar desses estudos fornecerem informações valiosas sobre a taxa de morte, concentração e o potencial de ação dos agentes antibacterianos, optamos por não aumentar o tempo.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, avaliou-se o potencial antimicrobiano de peptídeos selecionados a partir de algoritmos de predição. Sete peptídeos foram sintetizados, ao total, e avaliados contra cepas Gram-negativas e Gram-positivas. Os testes *in vitro* não geraram resultados que comprovassem atividade inibitória contra as cepas bacterianas, sendo avaliados em concentrações máximas de 256 µg.mL⁻¹. Sendo assim, para este trabalho, a prospecção *in silico*, a metaproteômica associada aos algoritmos de predição, identificou os peptídeos, mas estes não demonstraram atividade antimicrobiana.

Considerando que os peptídeos sintetizados prospectados do solo do Cerrado não demonstraram atividade antimicrobiana em concentrações elevadas, outra abordagem foi avaliada, onde foram utilizados os seguintes antimicrobianos: estreptomicina, cloranfenicol e aceturato de diminazeno, com o objetivo de avaliar sua atividade isolada e em combinação *in vitro* frente a cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Os dados apresentados no decorrer do trabalho corroboram com relatos de resistência na literatura, quando as cepas foram testadas contra os antimicrobianos sozinhos.

Dentre as duas combinações entre os antimicrobianos propostos no estudo, evidenciou-se que a associação de estreptomicina e aceturato de diminazeno demonstrou um potencial de atividade antimicrobiana sinérgico com menor valor de CIF (0,09), dentre os demais, obtido frente à *E. coli*. A mesma combinação também evidenciou um potencial favorável contra *K. pneumoniae*. Esta combinação se mostrou mais eficaz contra bactérias Gram-negativas. A segunda associação, de cloranfenicol e aceturato de diminazeno, também demonstrou um potencial de atividade com menor CIF (0,09) frente à *E. coli* KPC+. Apesar de ter demonstrado o maior potencial contra *E. coli*, esta associação se mostrou mais eficaz frente a bactérias Gram-positivas.

Com base nos resultados obtidos, a terapia combinada, proveniente da associação de estreptomicina e cloranfenicol juntamente com o aceturato de diminazeno, pode constituir uma alternativa terapêutica eficaz de tratamento frente a bactérias (resistentes ou não), reduzindo as doses administradas e potencializando os compostos em questão.

PERSPECTIVAS

- Avaliar a interação das combinações estreptomicina/cloranfenicol e aceturato de diminazeno com as cepas bacterianas por microscopia de força atômica;
- avaliar a citotoxicidade das combinações estreptomicina/cloranfenicol e aceturato de diminazeno frente a células humanas imunológicas.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; JENSER, L. B. Use of antimicrobials in food animal production. **Foodborne Diseases**, , p. 405–417, 2008.
- ABBASSI, F.; RAJA, Z.; OURY, B.; GAZANION, E.; PIESSÉ, C.; SERENO, D.; NICOLAS, P.; FOULON, T.; LADRAM, A. Antibacterial and leishmanicidal activities of temporin-SHd, a 17-residue long membrane-damaging peptide. **Biochimie**, v. 95, n. 2, p. 388–399, 2013.
- ABRAHAM, E.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v. 146, p. 837, 1940.
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037–1050, 2007.
- ALLEN, H. K.; DONATO, J.; WANG, H. H.; CLOUD-HANSEN, K. A. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 251–259, 2010.
- ALMAAYTAH, A.; QAOUD, M. T.; MOHAMMED, G. K.; ABUALHAIJAA, A.; KNAPPE, D.; HOFFMANN, R.; ID, Q. A. Antimicrobial and antibiofilm activity of UP-5, an ultrashort antimicrobial peptide designed using only arginine and biphenylalanine. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2018.
- ALMQUIST, J. A comparison of penicillin, streptomycin and sulfanilamide for improving the fertility of semen from bulls of low fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 34, n. 8, p. 819–822, 1951.
- ALTIERI, M. A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 74, n. 1–3, p. 19–31, 1999.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 260–271, 2010.
- ANDREI, S.; DROC, G.; STEFAN, G. FDA approved antibacterial drugs: 2018-2019. **Discoveries**, v. 7, n. 4, p. 2018–2019, 2019.
- ANGULO, F. J.; BAKER, N. L.; OLSEN, S. J.; ANDERSON, A.; BARRETT, T. J. Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 78–85, 2004.
- ANVISA. Boletim segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde nº 20: avaliação dos indicadores nacionais das IRAS e RM 2018. **Anvisa**, 2018.
- ANVISA. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. **Anvisa**, 2004.
- ANVISA. Resolução - RDC nº 44, de 26 de outubro de 2010. **Diário Oficial da**

União, 2010.

BACH, E.; CANNAVAN, F. S.; DUARTE, F. R. S.; TAFFAREL, J. A. S.; MUI, S.; BRANDELLI, A. Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 102–107, 2011.

BAGGERMAN, G.; VERLEYEN, P.; CLYNEN, E.; HUYBRECHTS, J.; LOOF, A. De; SCHOOF, L. Peptidomics. **Journal of Chromatography B**, v. 803, p. 3–16, 2004.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 1–10, 2000.

BARTLETT, J. G.; GILBERT, D. N.; SPELLBERG, B. Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 10, p. 1445–1450, 2013.

BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; CLAUDIO, L.; STASI, D.; JUNIOR, A. F. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 387–390, 2006.

BIOMÉRIEUX. What is antibiotic resistance? 2019. Disponível em: <https://amr.biomerieux.com/en/about-amr/what-is-antibiotic-resistance/>.

BONAPACE, C. R.; BOSSO, J. A.; FRIEDRICH, L. V.; WHITE, R. L. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, n. 4, p. 363–366, 2002.

BOOTH, N. H.; MCDONALD, L. E. Farmacologia e a terapêutica em veterinária. Rio de Janeiro, 1992.

BREIDENSTEIN, E. B. M.; JANOT, L.; STREHMEL, J.; FERNANDEZ, L.; TAYLOR, P. K.; KUKAVICA-IBRULJ, I.; GELLATLY, S. L.; LEVESQUE, R. C.; OVERHAGE, J.; HANCOCK, R. E. W. The lon protease is essential for full virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Plos One**, v. 7, n. 11, 2012.

BRENDER, G. C. et al. Veterinary applied pharmacology & therapeutics. Toronto, ed. 5, 1991.

BURNS, R. G.; DEFOREST, J. L.; MARXSEN, J.; SINSABAUGH, R. L.; STROMBERGER, M. E.; WALLENSTEIN, M. D.; WEINTRAUB, M. N.; ZOPPINI, A. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 58, p. 216–234, 2013.

BUSH, K.; AVE, P.; LOUIS, S. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 894–896, 2014.

CARTER, A. P.; CLEMONS, W. M.; BRODERSEN, D. E.; MORGAN-WARREN, R. J.; WIMBERLY, B. T.; RAMAKRISHNAN, V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 340–348, 2000.

CASSIR, N.; ROLAIN, J.; BROUQUI, P. A new strategy to fight antimicrobial resistance : the revival of old antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. October, p. 1–15, 2014.

CASTRO, R. A.; QUECINE, M. C.; LACAVALA, P. T.; BATISTA, B. D.; LUVIZOTTO, D. M.; MARCON, J.; FERREIRA, A.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **Springer Plus**, v. 3, n. 382, p. 1–9, 2014.

CATES, J.; CHRISTIE, R.; GARROD, L. Penicillin-resistant subacute bacterial endocarditis treated by a combination of penicillin and streptomycin. **British Medical Journal**, v. 1, n. 4708, p. 653–656, 1951.

CHANG, Q.; WANG, W.; REGEV-YOCHAY, G.; LIPSITCH, M.; HANAGE, W. P. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 3, p. 240–247, 2014.

CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B.; DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 827–834, 2014.

CHEEMA, U.; YOUNAS, B.; SULTAN, J.; IQBAL, A.; TARIQ, M.; WAHEED, A. Antimicrobial peptides: an alternative of antibiotics in ruminants. **Advances in Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 15–21, 2011.

CHENG, G.; HAO, H.; XIE, S.; WANG, X.; DAI, M.; HUANG, L.; YUAN, Z. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 217, p. 1–15, 2014.

CHOUREY, K.; JANSSON, J.; VERBERKMOES, N.; SHAH, M.; CHAVARRIA, K. L.; TOM, L. M.; BRODIE, E. L.; HETTICH, R. L. Direct cellular lysis/protein extraction protocol for soil metaproteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 12, p. 6615–6622, 2010.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2015.

CLYNEN, E.; BAGGERMAN, G.; VEELAERT, D.; CERSTIAENS, A.; HORST, D. Van Der; HARTHOORN, L.; DERUA, R.; WAELKENS, E.; LOOF, A. De; SCHOOF, L. Peptidomics of the pars intercerebralis-corpora cardiaca complex of the migratory locust, *Locusta migratoria*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 7, p. 1929–1939, 2001.

COETZEE, J.; CORCORAN, C.; PRENTICE, E.; MOODLEY, M.; MENDELSON, M.; POIREL, L.; NORDMANN, P.; BRINK, A. J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (MCR-1) among *Escherichia coli* isolated from South African patients. **The South Africa Medical Journal**, v. 106, n. 5, p. 449–450, 2016.

CRAMERI, R.; SCHULZ-KNAPPE, P.; ZUCHT, H. The Future of post-genomic

biology at the proteomic level: an outlook. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 8, n. 8, p. 807–810, 2005.

DANESH, A.; LJUNGH, Å.; MATTIASSON, B.; MAMO, G. Synergistic effect of haloduracin and chloramphenicol against clinically important Gram-positive bacteria. **Biotechnology Reports**, v. 13, p. 37–41, 2017.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23–27, 2010.

DRAGO, L.; VECCHI, E. De; NICOLA, L.; GISMONDO, M. R. In vitro evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, n. 111, p. 1–7, 2007.

DURACK, D. T.; PELLETIER, L. L.; PETERSDORF, R. G. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. II. Synergism between penicillin and streptomycin against penicillin-sensitive streptococci. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 53, n. 3, p. 829–833, 1974.

DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A.; UTILI, R.; FALAGAS, M. E. Do we still need the aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 3, p. 201–205, 2009.

EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2014. FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 25–64, 2014.

FARROKHI, N.; WHITELEGGE, J. P.; BRUSSLAN, J. A. Plant peptides and peptidomics. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, p. 105–134, 2008.

FERREIRA, M.; PAES, V.; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos. **Revista Medicina**, v. 87, n. 4, p. 272–276, 2008.

FJELL, C. D.; HISS, J. A.; HANCOCK, R. E. W.; SCHNEIDER, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 37–51, 2012.

FOSTER, T. *Staphylococcus*. **Medical Microbiology**, Galveston, 1996.

FOUNOU, L. L.; FOUNOU, R. C.; ESSACK, S. Y. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1881, p. 1–19, 2016.

GANGULY, N.; ARORA, N.; CHANDY, S.; FAIROZE, M. N.; GILL, J. P.; GUPTA, U.; HOSSAIN, S.; JOGLEKAR, S.; JOSHI, P.; KAKKAR, M.; KOTWAN, A.; RATTAN, A.; SUDARSHAN, H.; THOMAS, K.; WATTAL, C.; EASTON, A.; LAXMINARAYAN, R. Rationalizing antibiotic use to limit antibiotic resistance. **Indian Journal of Medical**

Research, v. 134, n. 3, p. 281–294, 2011.

GETEK, T. A.; VESTAL, M. L.; ALEXANDER, T. G. Analysis of gentamicin sulfate by high-performance liquid chromatography combined with thermospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 554, n. 1–2, p. 191–203, 1991.

GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic a helical antimicrobial peptides activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 21, p. 5589–5600, 2001.

GOODMAN, A. et al. The farmacological Basis of Therapeutics. 1996. .

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.

HOLT, K. E.; WERTHEIM, H.; ZADOKS, R. N.; BAKER, S.; WHITEHOUSE, C. A.; DANCE, D. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 27, 2015.

HU, Y.; LIU, L.; ZHANG, X.; FENG, Y.; ZONG, Z. In vitro activity of neomycin, streptomycin, paromomycin and apramycin against Enterobacteriaceae clinical strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2275, p. 1–7, 2017.

HUMPHRIES, R. M.; YANG, S.; HEMARAJATA, P.; WARD, K. W.; HINDLER, J. A.; MILLER, S. A. First report of ceftazidime-avibactam resistance in a KPC-3-expressing *Klebsiella pneumoniae* isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6605–6607, 2015.

ISOHERRANEM, N.; SOBACK, S. Chromatographic methods for analisis of aminoglycoside antibiotics. **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 5, p. 1017–1045, 1999.

IVANOV, V. T.; YATSKIN, O. N. Peptidomics : a logical sequel to proteomics. **Expert Review of Proteomics**, v. 2, n. 4, p. 463–473, 2005.

JACKSON, C.; AGBOKE, A.; NWOKE, V. In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 3, n. 9, p. 666–669, 2009.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DASDRANIA, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383–388, 2015.

JAWETZ, J. B. .; V.R.C. The combined action of penicillin with streptomycin or chloromycetin on Enterococci in vitro. **Science**, v. 111, n. 2880, p. 254–256, 1950.

JÚNIOR, H. A. M.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M. A. F.; LEBRE, D. T.; WANG, A. Y. Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel

industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “tandem” (CLAE-EM/EM). **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 586–592, 2006.

KAYSER, F. Medical microbiology. 2005.

KAZEMZADEH-NARBAT, M.; KINDRACHUK, J.; DUAN, K.; JENSSEN, H.; HANCOCK, R. E. W.; WANG, R. Biomaterials Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections. **Biomaterials**, v. 31, n. 36, p. 9519–9526, 2010.

KEHRENBERG, C.; SCHWARZ, S.; JACOBSEN, L.; HANSEN, L. H.; VESTER, B. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. v. 57, n. 4, p. 1064–1073, 2005.

KLEVENS, R. M.; MORRISON, M. A.; NADLE, J.; PETIT, S.; GERSHMAN, K.; RAY, S.; HARRISON, L. H.; LYNFIELD, R.; CRAIG, A. S.; ZELL, E. R.; FOSHEIM, G. E.; MCDUGAL, L. K.; CAREY, R. B.; FRIDKIN, S. K. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **JAMA**, v. 298, n. 15, p. 1763–1771, 2007.

KOCK, R.; KREIENBROCK, L.; DUIJKEREN, E. van; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance at the interface of human and veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 200, p. 1–5, 2017.

KOSIKOWSKA, P.; LESNER, A.; KOSIKOWSKA, P.; LESNER, A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003-2015). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 6, p. 689–702, 2016.

KUMAR, A. Role of microbes in food and industrial microbiology. **Journal of Food & Industrial Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 10–11, 2016.

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

LATA, S.; MISHRA, N. K. AntiBP2: improved version of antibacterial peptide prediction. **BMC Informatics**, v. 11, p. 1–7, 2010.

LEVINGS, R. S.; PARTRIDGE, S. R.; LIGHTFOOT, D.; HALL, R. M.; DJORDJEVIC, S. P. New integron-associated gene cassette encoding a 3-N-aminoglycoside acetyltransferase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 1238–1241, 2005.

LHERMIE, G.; GRÖHN, Y. T.; RABOISSON, D. Addressing antimicrobial resistance: an overview of priority actions to prevent suboptimal antimicrobial use in food-animal production. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 2114, p. 1–11, 2017.

LIU, Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L.-F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.;

ZHOU, H.; LIANG, Z.; JIAN-HUA LIU, J.; SHEN, I. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016.

LIVERMORE, D. M.; WARNER, M.; MUSHTAQ, S.; DOUMITH, M.; ZHANG, J.; WOODFORD, N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 5, p. 415–419, 2011.

LONG, K. S.; VESTER, B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 603–612, 2012.

LOOSE, C.; JENSEN, K.; RIGOUTSOS, I.; STEPHANOPOULOS, G. A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides. **Nature Letters**, v. 443, n. 7113, p. 867–869, 2006.

LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK, J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 572–577, 2002.
LORIAN, V. Antibiotics in laboratory medicine. Laboratory methods used to assess the activity of antimicrobial combinations. Baltimore, 2005.

MAGIORAKOS, A.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2011.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718–733, 2011.

MARTENS, E.; DEMAIN, A. L. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 5, p. 520–526, 2017.

MARZO, A.; BO, L. D. Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. **Journal of Chromatography A**, v. 812, n. 1–2, p. 17–34, 1998.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 497–505, 2010.

NARAYANA, J. L.; CHEN, J. Antimicrobial peptides: possible anti-infective agents. **Peptides**, v. 72, p. 88–94, 2015.

NEUHAUS, B.; HURLUT, J.; HAMMACK, W. LC MS/MS analysis of chloramphenicol in shrimp. **Food and Drug Administration**, n. 4290, p. 1–18, 2007.

NGUEWA, P. A.; FUERTES, M. A.; CEPEDA, V.; IBORRA, S.; CARRIÓN, J.; VALLADARES, B.; ALONSO, C.; PÉREZ, J. M. Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, n. 10, p. 1387–1400, 2005.

NORIEGA, E. . Nosocomial infection caused by gentamicin-resistant, streptomycin-sensitive *Klebsiella*. **The Journal of infectious diseases**, v. 131, p. 45–50, 1975.
OKDAH, A. L.; PAGE, S. Le; OLAITAN, A. O. New therapy from old drugs: synergistic bactericidal activity of sulfadiazine with colistin against colistin-resistant bacteria, including plasmid mediated colistin-resistant mcr-1 isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 5, p. 775–783, 2018.

OPAS; OMS. Rede de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços da Saúde. 2009.

OPLINGER, R. W.; WAGNER, E. J.; CAVENDER, W. Use of penicillin and streptomycin to reduce spread of bacterial coldwater disease II: efficacy of using antibiotics in diluents and during water hardening. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 27, n. 1, p. 32–37, 2015.

OSBURNE, M. S.; GROSSMAN, T. H.; AUGUST, P. R.; MACNEIL, I. A. Tapping into microbial diversity for natural products drug discovery. **ASM News**, v. 66, n. 7, p. 411–417, 2002.

PANKEY, G. A.; ASHCRAFT, D. S.; DORNELLES, A. Comparison of 3 Etest[®] methods and time-kill assay for determination of antimicrobial synergy against carbapenemase-producing *Klebsiella* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 3, p. 220–226, 2013.

PARK, Y.; PARK, S. N.; PARK, S.; SHIN, S. O.; KIM, J.; KANG, S.; KIM, M.; JEONG, C.; HAHM, K. Synergism of Leu – Lys rich antimicrobial peptides and chloramphenicol against bacterial cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, n. 1, p. 24–32, 2006.

PEREGRINE, A S; MAMMAN, M. Pharmacology of diminazene: a review. **Acta Tropica**, v. 54, n. 3–4, p. 185–203, 1993.

PEREGRINE, Andrew S. Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. **Veterinary Parasitology**, v. 54, n. 1–3, p. 223–248, 1994.

PIDDOCK, L. J. V. The crisis of no new antibiotics — what is the way forward ? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 249–253, 2012.

PILLAI, S.K; MOELLERING JR, R.C; ELIOPOULOS, G. . Antimicrobial Combinations. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005.

PINSETTA, F. Síntese e relação estrutura-toxicidade de derivados aminoglicosídeos como potenciais protótipos na busca de um fármaco seguro para o tratamento da Doença de Ménière. 2010.

PORTO, W. F.; FENSTERSEIFER, G. M.; FRANCO, O. L. In silico identification , structural characterization , and phylogenetic analysis of MdesDEF-2: a novel defensin from the Hessian fly, *Mayetiola destructor*. **Journal of Molecular Modeling**, v. 20, n. 2339, 2014.

PORTO, W. F.; PIRES, A.; FRANCO, O. L. CS-AMPPred : an updated SVM model for antimicrobial activity prediction in cysteine-stabilized peptides. **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012.

PORTO, W. F.; PIRES, A. S.; FRANCO, O. L. Computational tools for exploring sequence databases as a resource for antimicrobial peptides. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 3, p. 337–349, 2017.

PROCURANDO NEMO. Walt Disney Pictures Pixar Animation Studios. Animação 3D. Título Original: Finding Nemo. EUA, 2003 DVD: 100 min. Lançamento: 30 de Maio de 2003 (EUA); 4 de Julho de 2003 (Brasil). Direção: Andrew Stanton. Roteiro: Andrew Stanton. Produção: Graham Walters. Música: Thomas Newman.

RAMLI, S.; RADU, S.; SHAARI, K.; RUKAYADI, Y. Antibacterial activity of ethanolic extract of *Syzygium polyanthum* L. (Salam) leaves against foodborne pathogens and application as food sanitizer. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature Protocols**, v. 2, n. 8, p. 1896–1906, 2007.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; LISA K. NOLAN. Characterizing the APEC pathotype**. **Veterinary Research**, v. 36, p. 241–256, 2005.

RØNNING, H.; EINARSEN, K.; ASP, T. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1118, n. 2, p. 226–233, 2006.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 6, p. 431–437, 2001.

SHARMA, C.; ROKANA, N.; CHANDRA, M.; SINGH, B. P.; GULHANE, R. D.; GILL, J. P. S.; RAY, P.; PUNIYA, A. K.; PANWAR, H. Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, n. 237, p. 1–27, 2018.

SIKARWAR, A. S.; BATRA, H. V. Identification of *Klebsiella pneumoniae* by capsular polysaccharide polyclonal antibodies. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 2, n. 2, p. 130–134, 2011.

SILBERGELD, E. K.; GRAHAM, J.; PRICE, L. B. Industrial food animal production,

antimicrobial resistance, and human health. **Annual Review of Public Health**, v. 29, p. 151–169, 2008.

SILVA, P. **Farmacologia**. [S. l.]: Guanabara Koogan, 1994.

SILVERSTEIN, K. A. T.; JR, W. A. M.; WU, H. C.; UNDERWOOD, B. A.; GRAHAM, M. A.; TOWN, D.; VANDENBOSCH, K. A. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. **The Plant Journal**, v. 51, n. 2, p. 262–280, 2007.

SPELLBERG, B.; REX, J. H. The value of single-pathogen antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 1–6, 2013.

STEAD, D. A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. **Journal of Chromatography B**, v. 747, n. 1–2, p. 69–93, 2000.

STEFANOVIC, O. D.; STANOJEVI, D. D.; OMI, L. R. Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and antibiotics. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 69, n. 3, p. 457–463, 2012.

STOKES, J. M.; MACNAIR, C. R.; ILYAS, B.; FRENCH, S.; CÔTÉ, J. P.; BOUWMAN, C.; FARHA, M. A.; SIERON, A. O.; WHITFIELD, C.; COOMBES, B. K.; BROWN, E. D. Pentamidine sensitizes Gram-negative pathogens to antibiotics and overcomes acquired colistin resistance. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 17028, 2017.

TAMANG, J. P.; SHIN, D.; JUNG, S.; CHAE, S. Functional properties of microorganisms in fermented foods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 578, p. 1–13, 2016.

TAN, T. Y.; LIM, T. P.; HUI, W.; LEE, L.; SASIKALA, S.; HSU, L. Y.; KWA, A. L. In vitro antibiotic synergy in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: the effect of testing by time-kill, checkerboard, and Etest methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 436–438, 2011.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, p. 3–10, 2006.

THAKUR, N.; ROKANA, N.; PANWAR, H. Probiotics: selection criteria, safety and role in health and disease. **Journal of Innovative Biology**, v. 3, n. 1, p. 259–270, 2016.

TIAN, F.; YANG, L.; LV, F.; YANG, Q.; ZHOU, P. In silico quantitative prediction of peptides binding affinity to human MHC molecule: an intuitive quantitative structure-activity relationship approach. **Amino Acids**, v. 36, n. 3, p. 535–554, 2009.

TODD, J. K. Staphylococcal infections. **Pediatrics in Review**, v. 26, n. 12, p. 444–450, 2005.

TUNTASUVAN, D.; JARABRUM, W.; VISESHAKUL, N.; MOHKAEWA, K.; BORISUTSUWAN, S.; THEERAPHAN, A.; KONGKANJANA, N. Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazene aceturate. **Veterinary Parasitology**, v.

110, n. 3–4, p. 227–233, 2003.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 804–810, 2007.

TUVSHINTULGA, B.; ABOULAILA, M.; SIVAKUMAR, T.; TAYEBWA, D. S.; GANTUYA, S.; NARANBAATAR, K.; ISHIYAMA, A.; IWATSUKI, M.; OTOGURO, K.; ŌMURA, S.; TERKAWI, M. A. Chemotherapeutic efficacies of a clofazimine and diminazene aceturate combination against piroplasm parasites and their AT-rich DNA-binding activity on *Babesia bovis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 13888, p. 1–10, 2017.

TYERS, M.; WRIGHT, G. D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 141–155, 2019.

VILLETH, G. R.; JR, F. B. R.; TONIETTO, A.; HUERGO, L.; SOUZA, E. M. de; PEDROSA, F. O.; FRANCO, O. L.; MEHTA, A. Comparative proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the susceptible and the resistant cultivars of *Brassica oleracea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 298, p. 260–266, 2009.

WAGHU, F. H.; BARAI, R. S.; GURUNG, P.; IDICULA-THOMAS, S. CAMP R3 : a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. 1094–1097, 2016.

WAGHU, F. H.; GOPI, L.; BARAI, R. S.; RAMTEKE, P.; NIZAMI, B.; IDICULA-THOMAS, S. CAMP : Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 1154–1158, 2014.

WANG, G.; MISHRA, B.; LAU, K.; LUSHNIKOVA, T.; GOLLA, R.; WANG, X. Antimicrobial Peptides in 2014. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 1, p. 123–150, 2015.

WANG, H.; NAGHAVI, M.; ALLEN, C.; BARBER, R. M.; BHUTTA, Z. A.; CARTER, A.; CASEY, D. C.; CHARLSON, F. J.; CHEN, A. Z.; COATES, M. M.; COGGESHALL, M.; DANDONA, L.; DICKER, D. J.; ERSKINE, H. E.; FERRARI, A. J.; FITZMAURICE, C.; FOREMAN, K.; FOROUZANFAR, M. H.; FRASER, M. S.; ... MURRAY, C. J. L. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1459–1544, 2016.

WANG, S.; ZENG, X.; YANG, Q.; QIAO, S. Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, 2016.

WATER, J. .; SMART, S.; FRANZIK, H.; FOGED, C.; H.M, N. Nanoparticle-mediated delivery of the antimicrobial peptide plectasin against *Staphylococcus aureus* in infected epithelial cells. **European Journal of Pharmaceutics and**

Biopharmaceutics, v. 92, p. 65–73, 2015.

WEGENER, H. Antibiotic resistance - linking human and animal health. **Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop Summary.**, 2012.

WENDLANDT, S.; SCHWARZ, S.; SILLEY, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a food-borne pathogen? **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 117–139, 2013.

WESTEMEIER, R.; NAVEN, T. Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis. 2002.

WOLFE, J.; JOHNSON, W. Penicillin-sensitive streptococcal endocarditis. In-vitro and clinical observations on penicillin-streptomycin therapy. **Annals of Internal Medicine**, v. 81, n. 2, p. 178–181, 1974.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The Medical Impact of the Use of Antimicrobials in Food Animals. 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO's First Global Report on Antibiotic Resistance Reveals Serious Worldwide Threat to Public Health. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 175–186, 2007.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.

YOUNIS, W.; THANGAMANI, S.; SELEEM, M. N. Repurposing non-antimicrobial drugs and clinical molecules to treat bacterial infections. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 28, p. 4106–4111, 2015.

ZAVASCKI, A. P.; GIRARDELLO, R.; MAGAGNIN, C. M.; ANTOCHEVIS, C.; MACIEL, R. A.; PALMEIRO, J. K.; GALES, A. C. Emergence of polymyxin B resistance in a polymyxin B-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infection in a neutropenic patient during polymyxin B therapy. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 90, n. 2, p. 134–138, 2017.

ZHANG, L.; FALLA, T. Antimicrobial peptides : therapeutic potential. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 7, n. 6, p. 653–663, 2006.

ZHAO, F.; BAI, J.; WU, J.; LIU, J.; ZHOU, M.; XIA, S.; WANG, S.; YAO, X.; YI, H.; LIN, M.; GAO, S.; ZHOU, T.; XU, Z.; NIU, Y.; BAO, Q. Sequencing and genetic variation of multidrug resistance plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. **Plos One**, v. 5, n. 4, 2010.

ZHU, S. Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CSalpha defensins. v. 45, n. 3, p. 828–838, 2008.

ZUO, G.-Y.; WANG, C.; HAN, J.; LI, Y.; WANG, G. Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 23, n. 14, p. 1814–1820, 2016.